

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Nutrición y Bromatología II
(Bromatología)



**Estudio comparativo de las características analíticas de las
(cadmio y zinc) tioneinas y de moléculas orgánicas
intrínsecas a su estructura. Contribución a la determinación
de la forma química de estos compuestos**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

María Amalia Muñoz Piñeiro

Directores

Bartolomé Ribas Ozonas

Adela Rodríguez Fernández

Madrid 2005

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Bromatología y Técnicas Analíticas Farmacéuticas
(Nutrición y Bromatología II)
Laboratorio de Técnicas instrumentales

ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS CARACTERISTICAS ANALITICAS DE
LAS (CADMIO, ZINC)-TIONEINAS Y DE MOLECULAS ORGANICAS
INTRINSECAS A SU ESTRUCTURA. CONTRIBUCION A LA
DETERMINACION DE LA FORMA QUIMICA DE ESTOS COMPUESTOS.

TESIS DOCTORAL

M^a Amalia Muñoz Piñeiro
Madrid, Julio de 1990



MINISTERIO DE SANIDAD Y CONSUMO

INSTITUTO DE SALUD CARLOS III

SUBDIRECCION GENERAL DE CONTROL

Dña ADELA RODRIGUEZ FERNANDEZ, CATEDRATICA DE QUIMICA ANALITICA DE LA UNIVERSIDAD DE ALCALA DE HENARES Y JEFE DEL GRUPO "CIENCIA ANALITICA" DEL C.C.I., Geel (Bélgica) Y D. BARTOLOME RIBAS OZONAS, JEFE DEL DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGIA DEL CENTRO NACIONAL DE SANIDAD AMBIENTAL DEL INSTITUTO DE SALUD CARLOS III, Madrid, CODIRECTORES DEL PRESENTE TRABAJO DE INVESTIGACION.

CERTIFICAN que Dña Ma Amalia Muñoz Piñeiro ha realizado en el grupo "Ciencia Analítica" del C.C.I., Geel, (Bélgica), bajo nuestra dirección, el trabajo titulado: "Estudio comparativo de las (cadmio, zinc)tionéinas y de moléculas orgánicas intrínsecas a su estructura. Contribución a la determinación de la forma química de estos compuestos" para optar al grado de Doctor en Farmacia, por lo que autorizamos su presentación como Tesis Doctoral, ya que a nuestro juicio, se han cubierto los objetivos propuestos.

Y para que conste, expedimos y firmamos el presente certificado en Madrid, a veintiocho de junio de mil novecientos noventa y dos.

Edo: Adela Rodríguez

Edo: Bartolomé Ribas

B. Ribas



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE NUTRICION Y BROMATOLOGIA II
(Bromatología y Técnicas Analíticas Farmacéuticas)

Dña. M^{ae}ESPERANZA TORIJA ISASA, CATEDRATICA Y DIRECTORA DEL
DEPARTAMENTO DE BROMATOLOGIA Y TECNICAS ANALITICAS FARMACEUTICAS
(NUTRICION Y BROMATOLOGIA II) DE LA FACULTAD DE FARMACIA DE LA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

CERTIFICA: que el presente trabajo de investigación titulado:
"Estudio comparativo de las características de las
(cadmio,zinc)tionéinas y de moléculas orgánicas
intrínsecas a su estructura. Contribución a la
determinación de la forma química de estos
compuestos", constituye la Memoria presentada por
Dña. M^a Amalia Muñoz Piñeiro para optar al grado de
Doctor en Farmacia y reúne las condiciones exigidas
para su lectura y defensa pública.

Lo que certifico en Madrid a uno de julio de mil
novecientos noventa y dos.

Esperanza Torija

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi gratitud, en primer lugar, a los directores de la tesis:

- Prfa. Dra. Adela Rodríguez Fernández, con quién he compartido la mayor parte de este periodo de formación postgraduado, cuya supervisión ha sido fundamental para la conclusión de este trabajo.

- Dr. Bartolomé Ribas Ozonas, que me transmitió su entusiasmo por el tema objeto de estudio, cuyo apoyo y ayuda científica ha sido continua a lo largo de este periodo.

A mi tutor, el Prf. Dr. Benito del Castillo García, Catedrático de Técnicas Instrumentales, quien además de supervisar el trabajo, me brindó la oportunidad y toda la ayuda necesaria para poder llevar a cabo mi formación doctoral.

A la Prfa. Dra. M^a Esperanza Torija Isasa, Directora del Departamento de Nutrición y Bromatología II, por su desinteresada ayuda.

Al Dr. Müller, director del "Joint Research Center" (C.B.N.M.) de Geel, Bélgica, quien puso a mi disposición todos los medios materiales a su alcance, que me permitieron la realización de este trabajo.

Al Dr. Jaques Chivot, con quien he trabajado durante un año, por su desinteresada ayuda.

A todo el Laboratorio de Técnicas Instrumentales por el apoyo y la paciencia que han tenido conmigo durante el tiempo que he compartido con ellos, en especial a M^a Antonia, Ana, Silvia y Mercedes.

A Beatriz López Ruiz quien me enseñó todo lo que sé de Polarografía y siempre me ha ayudado.

A Adolfo Alonso, un amigo que en todo momento, durante mi estancia en el extranjero, me brindó su ayuda y apoyo moral.

A mis padres y hermanos por la comprensión que han tenido conmigo durante este periodo.

Por último señalar que este trabajo ha podido llevarse a cabo gracias a la beca concedida por la C.E.E.

a mis padres

INDICE DE LA MEMORIA

I.	INTRODUCCION.....	1
II.	COMPUESTOS METAL-PROTEINA. IMPORTANCIA EN LOS SISTEMAS BIOLOGICOS.....	11
II.A.	INTRODUCCION.....	12
II.B.	DEFINICION, ESTRUCTURA Y CARACTERISTICAS DE LAS METALOTIONEINAS.....	14
II.B.1.	INTRODUCCION.....	14
II.B.2.	INTERACCION ION METALICO-PROTEINA.....	15
II.B.3.	METALOTIONEINAS:DESCUBRIMIENTO Y EVOLUCION CRONOLOGICA.....	17
II.B.4.	METALOTIONEINAS: DEFINICION, NOMENCLATURA Y PRESENCIA EN LA NATURALEZA.....	20
II.B.4.A.	DEFINICION.....	20
II.B.4.B.	NOMEMCLATURA.....	21
	- Nomenclatura de la metalotioneina.....	21
	- Nomenclatura de las multiples formas de metalotioneina.....	22
II.B.4.C.	PRESENCIA EN LA NATURALEZA.....	23
II.B.5.	CARACTERISTICAS DE LAS METALOTIONEINAS.....	24
II.B.5.A.	DETERMINACION DE LA MASA MOLECULAR RELATIVA.....	24
II.B.5.B.	ESTRUCTURA DE LA METALOTIONEINA.....	25
	- Composicion y secuencia aminoacidica.....	25
	- Posiciones de enlace al cation y configuracion espacial.....	28
	- Enlace cation-tioneina: Afinidad de los cationes metalicos.....	34
	- Isometalotioneinas. Aislamiento y separacion.....	36
II.B.5.C.	COMPORTAMIENTO EN FUNCION DEL pH.....	38

II.B.5.D. COMPORTAMIENTO ESPECTROSCOPICO.....	39
II.B.6. SIGNIFICADO DE LAS METALOTIONEINAS EN EL METABOLISMO.....	41
II.B.6.A. BIOSINTESIS: INDUCCION E INHIBICION.....	41
II.B.6.B. DEGRADACION.....	42
II.B.6.C. ANTIGENICIDAD.....	44
II.B.6.D. FUNCIONES METABOLICAS RELACIONADAS CON LOS METALES.....	45
- Detoxificacion de cationes.....	45
- Transporte metalico.....	46
- Homeostasis de cationes.....	47
- Activacion de metaloenzimas.....	48
II.C. ELEMENTOS METALICOS EN SISTEMAS BIOLOGICOS. ANALISIS DE SU CONTENIDO Y ESTUDIO DE SU BIODISPONIBILIDAD.....	49
II.C.1. INTRODUCCION.....	49
II.C.2. LOS ELEMENTOS QUIMICOS EN LOS SISTEMAS BIOLOGICOS.....	51
II.C.2.A. ELEMENTOS TRAZA.....	52
II.C.2.B. FUNCIONES BIOLOGICAS DE LOS ELEMENTOS TRAZA MAS IMPORTANTES.....	56
II.C.2.C. NIVELES DE CONCENTRACIONES "NORMALES" DE ELEMENTOS TRAZA. RELACION CON SU TOXICIDAD.....	59
II.C.2.D. RELACION ENTRE TOXICOLOGIA Y FORMA QUIMICA.....	61
II.C.3. DETERMINACION DE ELEMENTOS TRAZA EN MATERIALES BIOLOGICOS.....	66
II.C.3.A. GENERALIDADES.....	66
II.C.3.B. ELECCION DEL METODO ANALITICO.....	68
II.C.3.C. PRINCIPALES TECNICAS EMPLEADAS EN EL ANALISIS DE TRAZAS.....	72
II.C.3.D. ESPECIACION EN ANALISIS.....	76
- Definicion.....	76

- Metodos analíticos más empleados en especiación.....	78
II.C.4. DETERMINACION DEL CONTENIDO TOTAL DE METALOTIONEINAS EN RELACION AL CATION ASOCIADO.....	83
III. DETERMINACION DEL CONTENIDO METALICO EN LAS METALOTIONEINAS.....	86
III.A. INTRODUCCION.....	87
III.B. PARTE EXPERIMENTAL.....	88
III.B.1. PRODUCTOS UTILIZADOS.....	88
III.B.2. APARATOS.....	89
III.B.3. MODO OPERATORIO.....	90
III.B.3.A. ESPECTROSCOPIA DE ABSORCION ATOMICA CON HORNO DE GRAFITO (ET-AAS).....	90
III.B.3.B. POLAROGRAFIA DE IMPULSOS DIFERENCIAL (DPP).....	91
III.C. RESULTADOS Y DISCUSION.....	92
III.C.1. ESPECTROSCOPIA DE ABSORCION ATOMICA CON HORNO DE GRAFITO (ET-AAS).....	92
III.C.1.A. OPTIMIZACION DE PARAMETROS.....	92
III.C.1.B. CARACTERISTICAS ANALITICAS DEL METODO....	94
III.C.2. METODOS ELECTROQUIMICOS: METODOS VOLTAMETRICOS.....	95
III.C.2.A. OPTIMIZACION DE PARAMETROS.....	95
III.C.2.B. CARACTERISTICAS DEL METODO.....	97
III.C.3. DETERMINACION DEL CONTENIDO DE CATIONES METALICOS.....	99
III.C.3.A. MUESTRAS COMERCIALIZADAS POR S.I.G.M.A.....	99
III.C.3.B. MUESTRAS SINTETIZADAS EN EL INSTITUTO DE SALUD CARLOS III.....	101

IV. ESTUDIO ESPECTROFOTOMETRICO DE LAS METALOTIONEINAS Y COMPUESTOS INTRINSECOS A SU ESTRUCTURA: L-CISTEINA Y FRAGMENTO 56-61 DE LA MT-I.....	103
IV.A. INTRODUCCION.....	104
IV.B. PARTE EXPERIMENTAL.....	131
IV.B.1. APARATOS.....	131
IV.B.2. REACTIVOS.....	131
IV.B.3. PREPARACION DE DISOLUCIONES.....	132
IV.B.4. MODO OPERATORIO.....	136
IV.C. RESULTADOS Y DISCUSION.....	138
IV.C.1. ESTUDIO DEL MEDIO UTILIZADO.....	138
IV.C.2. CISTEINA.....	143
IV.C.2.A. INFLUENCIA DEL MEDIO.....	145
IV.C.2.B. COMPORTAMIENTO EN FUNCION DEL pH.....	146
a) Medio TRIS.....	146
b) Medio fosfato.....	150
IV.C.2.C. ADICION DE CATIONES METALICOS.....	152
a) Adiciones de cadmio.....	153
b) Adiciones de zinc.....	160
IV.C.2.D. ABSORCION EN FUNCION DE LA CONCENTRACION.....	163
a) Medio fosfato.....	166
b) Medio TRIS HCl.....	169
IV.C.3. FRAGMENTO 56-61 DE LA MT-I.....	173
IV.C.3.A. INFLUENCIA DEL MEDIO.....	173
IV.C.3.B. INFLUENCIA DEL pH.....	174
a) Medio TRIS $2.5 \cdot 10^{-3} M$ en atmósfera de O_2	174
b) Medio TRIS $2.5 \cdot 10^{-3} M$ en atmósfera inerte...	177
c) Medio fosfato $5 \cdot 10^{-3} M$ en atmósfera inerte..	181
d) Comparación entre medios.....	181
IV.C.3.C. ADICION DE CATIONES.....	185
a) Adiciones de cadmio.....	186
b) Adiciones de cadmio en TRIS y en presencia de oxígeno.....	186

c) Adiciones de cadmio en TRIS y en atmósfera inerte.....	186
d) Adiciones de cadmio en fosfato y en atmósfera inerte.....	196
e) Estudio en función del pH de una disolución de fragmento más cadmio.....	196
f) Adiciones de zinc.....	200
IV.C.3.D. ESTUDIO DE LA ABSORBANCIA EN FUNCION DE LA CONCENTRACION.....	205
IV.C.4. METALOTIONEINAS.....	211
IV.C.4.A. ESTABILIDAD DE LAS METALOTIONEINAS.....	212
IV.C.4.B. INFLUENCIA DEL MEDIO.....	214
IV.C.4.C. COMPORTAMIENTO EN FUNCION DEL pH.....	214
a) MT r.l. en TRIS $2.5 \cdot 10^{-2} M$	214
b) MT r.l. en TRIS $2.5 \cdot 10^{-2} M$	217
c) MT r.l. en fosfato $5.0 \cdot 10^{-2} M$	221
d) Reversibilidad del equilibrio $M+T \rightleftharpoons MT$ en función del pH.....	225
IV.C.4.D. ADICIONES PATRON.....	230
a) Adiciones patrón de cisteína.....	230
b) Adiciones patrón de cadmio.....	230
c) Adiciones patrón de platino.....	232
IV.C.4.E. ABSORBANCIA EN FUNCION DE LA CONCENTRACION.....	236
a) $A=f(c)$ para la MT r.l. Influencia del medio.....	236
b) Absorbancia en función de la concentra- ción para las cinco metalotioneínas.....	244
IV.D. DISCUSION GENERAL.....	257

V.	ESTUDIO ELECTROQUIMICO DE LAS METALOTIONEINAS, LA CISTEINA Y EL FRAGMENTO TERMINAL 56-61.....	260
V.A.	INTRODUCCION.....	261
V.B.	PARTE EXPERIMENTAL.....	277
V.B.1.	APARATOS.....	277
V.B.2.	MUESTRAS.....	277
V.B.3.	PREPARACION DE DISOLUCIONES.....	278
V.B.4.	METODOS ELECTROQUIMICOS EMPLEADOS.....	280
V.C.	RESULTADOS Y DISCUSION.....	283
V.C.1.	METALOTIONEINAS.....	283
V.C.1.A.	COMPORTAMIENTO DE LAS METALOTIONEINAS EN FUNCION DEL PH.....	283
a)	Influencia del pH en los potenciales de reducción.....	290
b)	Influencia del pH en la intensidad del pico.....	294
c)	MT r.l. y MT h.k. a pH 7.5 y 2.0. Cálculo de las constantes aparentes de formación de complejos.....	295
d)	Cálculo de las constantes de asociación...	300
e)	Medio fosfato.....	304
V.C.1.B.	DETERMINACION DE LOS PARAMETROS CARACTERISTICOS n Y D.....	306
a)	Polarografía clásica.....	307
a ₁)	Cálculo del número de electrones.....	307
a ₁₁)	Medio TRIS.....	307
a ₁₂)	Medio fosfato.....	311
a ₁)	Cálculo del coeficiente de difusión...	314
b)	Polarografía de impulsos diferencial.....	315
b ₁)	Cálculo del número de electrones.....	315
b ₂)	Cálculo del coeficiente de difusión...	316

V.C.1.C. ADICIONES PATRON.....	323
a) Adiciones de cadmio a pH=7.5.....	323
b) Adiciones de zinc a diferentes pH.....	328
c) Cálculo de las constantes de formación de complejos CdT y CdT'.....	338
V.C.1.D. ESTABILIDAD DE LA METALOTIONEINA.....	342
a) Polarografía de impulsos diferencial.....	342
- Cálculo de los pK'.....	348
b) Redisolución anódica.....	351
c) Estabilidad en D.P.S.....	352
V.C.1.E. INFLUENCIA DE LOS FENOMENOS DE ADSORCION.....	356
a) Intensidad de pico en función del tiempo de depósito.....	358
b) Influencia del tamaño de gota.....	363
V.C.1.F. INTENSIDAD DE PICO EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN.....	365
V.C.2. CISTEINA.....	380
V.C.2.A. COMPORTAMIENTO A DIFERENTES pH.....	380
V.C.2.B. ABSORBANCIA EN FUNCION DE LA CONCENTRACION.....	383
V.C.2.C. ESTUDIO EN FUNCION DE LA CONCENTRACION....	386
V.C.3. FRAGMENTO.....	389
V.C.3.A. COMPORTAMIENTO EN FUNCION DEL pH.....	389
V.C.3.B. COMPORTAMIENTO POLAROGRAFICO Y ESTABILIDAD DEL FRAGMENTO ASOCIADO A CADMIO Y ZINC.....	396
a) Cadmio.....	397
b) Zinc.....	397
c) Cadmio + zinc.....	399
d) Polarogramas en función del tiempo.....	401
V.C.3.C. ADICIONES PATRON DE CADMIO Y/O ZINC A DIFERENTES pH.....	403
a) Adiciones patrón de cadmio al fragmento...	403
b) Adiciones de cadmio y zinc a una	

disolución de fragmento.....	407
b ₁) pH 8.9 y 7.5.....	408
b ₂) pH 3.71.....	421
b ₃) pH 1.9.....	425
c) Constantes aparentes de estabilidad.....	425
d) Discusión.....	430
V.C.3.D. ADICIONES DE FRAGMENTO A LA METALOTIONEINA.....	433
V.C.3.E. ESTUDIO EN FUNCION DE LA CONCENTRACION....	437
V.D. CONSIDERACIONES GENERALES.....	440
VI. CONCLUSIONES.....	446
ANEXO I.....	467
BIBLIOGRAFIA.....	471

I. INTRODUCCION

I. INTRODUCCION

Las metalotioneínas son un grupo particular de proteínas metálicas, que se localizan en el tejido parenquimatoso de casi todos los órganos y presentan una amplia distribución en la naturaleza. Se caracterizan principalmente por presentar un bajo peso molecular próximo a 6000-7000 daltons, un elevado contenido metálico, una composición aminoacídica determinada con alto contenido en cisteína y ausencia de aminoácidos aromáticos y de histidina; esta secuencia aminoacídica es única y presenta una distribución fija de los residuos de cisteína. Las metalotioneínas tienen características ópticas de los enlaces metal-tiólato.

Por su elevado contenido metálico, 7-12 átomos de metal por mol de proteína, se piensa que presentan un papel fundamental en el metabolismo de dichos cationes, actuando como agente detoxificador de cationes, como transportador y como regulador del mecanismo homeostático de cationes esenciales tales como el cadmio y/o el zinc.

Desde su descubrimiento por Margoshes y Vallee en 1957 se han llevado a cabo numerosos estudios con objeto de caracterizar estas moléculas desde diversos puntos de vista: bioquímico, biológico, metabólico, químico, etc. Sin embargo, en la actualidad todavía no se conoce, de forma completa y exacta, su estructura, su comportamiento y los mecanismos de acción, por lo que existe la posibilidad de ampliar los conocimientos existentes sobre estas moléculas por diferentes métodos. Es por ello por lo que, cualquiera que sea la orientación de los estudios que se realizan, la aportación de datos para su mejor comprensión y conocimiento presenta un gran interés.

En la literatura existen numerosos estudios orientados a elucidar el papel bioquímico, el metabolismo y la inducción de

estas moléculas; sin embargo, son raras aquéllas con un enfoque puramente analítico excepto los que se consagran a la determinación de su estructura espacial. Los métodos analíticos son imprescindibles para su control, su estudio, su caracterización, separación y propiedades.

Dentro de las propiedades de las metalotioneínas hay que destacar su capacidad para unirse a cationes metálicos, por lo que desde el punto de vista analítico, se puede considerar como una molécula con propiedades complejantes y orientar su estudio hacia la caracterización del equilibrio de complejación de cationes metálicos, considerado como un simple equilibrio químico. Aunque el comportamiento de las metalotioneínas en su entorno real, en los organismos vivos, sea mucho más complejo, los estudios que se realizan "in vitro" son una aproximación preliminar y necesaria para la mejor comprensión de los fenómenos "in vivo". "In vivo" pueden existir fenómenos superpuestos, pues los organismos vivos son sistemas dinámicos, el entorno de la reacción no es un compartimento estanco donde todos los factores se mantienen constantes sino que existen mecanismos de biosíntesis y degradación que controlan, según las necesidades orgánicas, el contenido de estos compuestos, existe un intercambio de cationes entre ligandos, etc. de aquí la complejidad y dificultad fundamental que presentan los estudios biológicos. El empleo de compuestos sintetizados comercializados de los que se conocen las principales características, aunque no tienen por que ser análogos a los existentes en medio vivo son imprescindibles para llevar a cabo los estudios fundamentales sobre sus propiedades físico-químicas. Por otra parte, es la única manera de fijar unas condiciones experimentales dadas en donde se puede modificar y controlar cada uno de los parámetros que intervienen en el proceso. Estos estudios fundamentales nos proporcionan el conocimiento de las propiedades físico-químicas del compuesto en estudio.

Los métodos analíticos son necesarios para conocer la forma química de los compuestos que intervienen en particular la de los

cationes metálicos y, por lo tanto, su disponibilidad. De ahí la importancia del trabajo que se presenta que se puede considerar como una contribución al estudio de las propiedades de las metalotioneínas y que puede completar las aportaciones del conjunto de trabajos realizados con diferentes objetivos.

El objetivo de esta memoria se alcanza no con una técnica única, sino con la combinación de varias técnicas. En nuestro estudio del comportamiento analítico de las metalotioneínas y en particular de las interacciones entre los cationes metálicos y la molécula orgánica, considerada como un ligando se ha empleado la información obtenida por diferentes técnicas analíticas. Resulta evidente que nuestro objetivo no se puede alcanzar con el empleo de una única técnica y que es necesario conocer el comportamiento de esta molécula compleja desde diferentes aspectos. En primer lugar se utiliza la espectrometría de absorción atómica, como método elemental con el fin de determinar la concentración total de los cationes metálicos contenidos en las diferentes proteínas comercializadas. Este método analítico no permite discriminar la forma química de los cationes, por lo que es conveniente la utilización de otros métodos analíticos cuya respuesta depende de la forma química de los compuestos y, por lo tanto, de los equilibrios en disolución, tales como la espectrofotometría de absorción molecular UV-Visible y los métodos voltamperométricos. La información obtenida por cromatografía líquida puede ser de gran utilidad, pero el empleo de técnicas cromatográficas se saldría del marco de nuestro estudio.

Las técnicas voltamperométricas y, en particular los métodos polarográficos, constituyen la aportación más importante del estudio que se presenta. En este caso, la respuesta analítica es rica y proporciona una información valiosa ya que en la molécula de metalotioneína están contenidos compuestos con diferentes posibilidades de presentar propiedades electroquímicas, los cationes metálicos asociados a la molécula y los grupos tioles contenidos en la estructura de la tioneína. La ventaja que

presenta la molécula orgánica objetivo de nuestro trabajo, es que es electroactiva y su respuesta se modifica cuando se encuentra asociada a cationes metálicos, dependiendo además de la forma en que se produzca esta coordinación; también se observa como la respuesta del catión es diferente a la que presentan en su forma libre ya que se encuentran complejados. Esto nos proporciona información sobre la especie química que se encuentra en la disolución. Este tipo de información también es aportada por la espectrofotometría U.V., ya que la parte orgánica de la molécula presenta una absorción característica de los enlaces peptídicos y de los grupos tiólicos libres próxima a los 200nm y otra específica de los enlaces metal-tiolato.

La mayor parte de los trabajos publicados por diferentes autores y que se citan en la exposición de esa memoria han sido realizados con metalotioneínas sintetizadas, específicamente para dichos trabajos, por laboratorios asociados, en las condiciones apropiadas para esos estudios concretos. Al no ser el objeto de nuestro estudio de carácter biológico, sino más analítico, hemos considerado que las metalotioneínas comercializadas poseen características adecuadas para poder ser utilizado. En efecto, nuestro estudio se ha orientado hacia las propiedades fundamentales de las metalotioneínas y, por lo tanto, se requiere que las condiciones experimentales sean reproducibles y que se puedan controlar los parámetros como el medio, el pH y la concentración. Esto sólo se consigue "in vitro" y siempre que se parta de una muestra cuyas características sean fijas, por lo que las muestras comercializadas son apropiadas. Otra ventaja adicional de estos compuestos comercializados por SIGMA es que provienen de dos orígenes diferentes y poseen estructura distinta lo que nos permite realizar una comparación. Somos al mismo tiempo conscientes que el número de metalotioneínas empleadas en este estudio es limitado para extrapolar, con un cierto rigor, las conclusiones que se deducen al caso de otras metalotioneínas de origen y estructura diferente. Sin embargo, si se comparan los datos existentes en la literatura sobre las propiedades de las metalotioneínas y que se mencionan a lo largo de este trabajo,

estas metaloproteínas presentan propiedades análogas, independientemente del origen de las mismas, por lo que pensamos que el estudio realizado es lo suficientemente significativo para poder aportar algunos datos que permitan ahondar en el mejor conocimiento de esta molécula.

La metalotioneína es una molécula compleja, cuya caracterización presenta dificultades. Con el fin de abordar los problemas de una manera más simple y poder realizar comparaciones se han realizado estudios paralelos del fragmento terminal 56-61 de la isoforma-I de la metalotioneína, de composición y estructura conocida, como parte intrínseca y constituyente de la metalotioneína. Esta molécula incluye la unidad fundamental para realizar la complejación de los cationes metálicos, responsable de la función biológica de la metalotioneína, los grupos tiólicos, que además es responsable de su actividad polarográfica. Se ha efectuado, así mismo, un ensayo comparativo con cisteína, unidad básica e importante de la molécula ya que es la que porta el grupo tiólico. El interés mayor del estudio de estos compuestos intrínsecos a la estructura de la metalotioneína es la posibilidad de fijar y conocer más fácilmente las condiciones experimentales, en particular concentración, puesto que su peso molecular es conocido; por otra parte, el hecho de que no contenga cationes metálicos en su molécula permite analizar, de manera controlada por adición de cada uno de los cationes contenidos en la metalotioneína, cadmio y zinc, separadamente, el fenómeno de complejación. Sería interesante poder disponer de moléculas análogas al fragmento, péptidos de diferente tamaño como los sintetizados específicamente para algún estudio o bien disponer de la apotioneína, la metalotioneína libre de cationes. Sería factible realizar la síntesis de dichos péptidos, pero no es el objetivo de nuestro estudio. La utilización de este fragmento 56-61 comercializado por SIGMA tiene por objeto comparar y buscar analogías y diferencias, desde el punto de vista de las propiedades fisico-químicas, en función del tamaño molecular y de la presencia o no de cationes metálicos.

El objetivo de este trabajo es caracterizar y determinar las metalotioneínas y sus propiedades de complejación.

En esta memoria se expone, en primer lugar, una revisión bibliográfica para conocer los avances de la investigación en este tema. Se ha dividido en dos partes, una de ellas dedicada a las metalotioneínas como pertenecientes al grupo de proteínas metálicas y la otra consagrada a la importancia, desde el punto de vista bioquímico, de la determinación de los cationes metálicos y del estudio de su biodisponibilidad. Esta primera parte, nos permite evaluar los dominios de interés, conocer las características desde el punto de vista estructural, propiedades de afinidad por los metales, etc, que nos ayudarán a contrastar nuestros resultados con la información aportada por otros autores.

Para iniciar cualquier estudio es necesario conocer la cantidad de metal presente en las metalotioneínas. Para ello se han empleado dos técnicas, la espectroscopía de absorción atómica y la polarografía diferencial de impulsos a pH muy ácido. Los resultados obtenidos por ambos métodos son análogos. Esto se describe en el capítulo II de esta memoria.

El tercer capítulo está dedicado al estudio espectrométrico de la metalotioneína, del fragmento 56-61 y de la cisteína. Como se ha dicho, el espectro depende de la estructura y de la unión metal-tioneína. Como ya se ha mencionado, las características de absorción en el ultravioleta de este tipo de compuestos depende, por una parte, de la estructura de la parte orgánica y, por otra, de la unión metal-tioneína. En esta molécula compleja, el origen de la contribución a la absorción depende de los enlaces peptídicos y de los grupos tiólicos libres que constituyen la parte orgánica de la molécula, en un intervalo de longitud de onda determinado y a otra longitud de onda diferente se produce una absorción propia de los enlaces catión-tiolato. En primer lugar, se presentan los estudios realizados, por espectrofotometría, agrupados en una tabla para tener una idea

de diverso origen, en función de diferentes parámetros que influyen en el comportamiento electroquímico de estos compuestos, tales como pH de la disolución, naturaleza del medio, adición de cationes metálicos. Se ha realizado, así mismo, un estudio sobre la evolución de la metalotioneína en función del tiempo con el objeto de conocer su estabilidad. La respuesta polarográfica, intensidad de pico, es proporcional a la concentración del compuesto en disolución, por lo que se han realizado diferentes experiencias en función de la cantidad presente para cada compuesto estudiado. Un aspecto importante que se describe es la atribución de picos polarográficos, a un potencial dado, característicos de un compuesto determinado. Además se indican, para las metalotioneínas, los parámetros fundamentales de un proceso electroquímico, coeficiente de difusión, D , en un sistema regido por la difusión estacionaria y número de electrones que se intercambian, n .

De los resultados obtenidos se describen los diferentes complejos que se forman entre los cationes estudiados, cadmio y zinc y la tioneína o el fragmento y la manera de discriminarlos mediante los métodos electroquímicos estudiados. Se deducen algunas características de estos complejos, metal-tioneína y metal-fragmento, tales como las constantes aparentes de estabilidad del equilibrio de complejación. Este capítulo concluye con unas consideraciones generales del mecanismo electroquímico responsable de la respuesta polarográfica, así como de las analogías que existen entre las propiedades y características de las metalotioneínas y del fragmento.

A continuación se presentan las conclusiones más interesantes que se pueden deducir de los resultados de esta memoria. Se discute la aplicación del método polarográfico para la determinación de la forma química de los diferentes compuestos, en particular la especiación de cationes metálicos libres y asociados a la tioneína.

Por último se indican las perspectivas futuras de continuación de este trabajo de investigación. En íntima relación con lo expuesto se puede citar el estudio en función del pH para todas las metalotioneínas comercializadas, la ampliación de las experiencias realizadas de adiciones de cationes metálicos, cadmio y zinc al fragmento en una amplia gama de pH, etc.

Por otra parte desde el punto de vista del empleo de métodos electroquímicos el trabajo puede orientarse, en un futuro, hacia el empleo de otras técnicas como la voltamperometría cíclica. De interés, sin duda, será el empleo de ultramicroelectrodos, bien sean sólidos o modificados con un compuesto determinado.

II. COMPUESTOS METAL-PROTEINA
IMPORTANCIA EN LOS SISTEMAS BIOLÓGICOS

II.A. INTRODUCCION

Las metalotioneínas, proteínas de características particulares ligadas a diferentes cationes metálicos, presentan una amplia distribución en la naturaleza, localizándose en la fracción citoplasmática de tejidos parenquimatosos, en el hombre se localiza en casi todos los órganos (1) destacando el hígado y el riñón. Su amplia distribución en todos los "Phylum" de la naturaleza, así como la conservación de varias características estructurales a lo largo de la evolución de las especies, hacen pensar que esta proteína ocupa un papel central en el metabolismo metálico (2,3), de aquí que los bioquímicos, fisiólogos, toxicólogos, nutriólogos y médicos le dediquen cada vez mayor atención.

Por lo tanto, nos ha parecido interesante, con el fin de situar el tema objeto de nuestro estudio, realizar una revisión bibliográfica de los trabajos efectuados hasta la fecha sobre las propiedades y características de estos compuestos, en particular en relación a los cationes asociados a su estructura proteica. Esta revisión se ha dividido en dos partes.

En la primera, se expone, en primer lugar, las generalidades sobre este tipo de moléculas y la evolución en el conocimiento de sus funciones desde su descubrimiento hasta la época actual. Seguidamente se presentan las características más importantes de este tipo de compuestos, en relación con su estructura orgánica, secuencia de aminoácidos, con las posibilidades que tienen de unirse a cationes metálicos. Por último, el papel que pueden desempeñar las metalotioneínas en el metabolismo de los seres vivos, con especial énfasis en las funciones metabólicas relacionadas con los cationes metálicos.

En el siguiente apartado se presenta, por una parte, la importancia que tiene los elementos traza en los sistemas

biológicos y la relación existente entre los niveles de concentración de los mismos y su aceptación o rechazo por el organismo hasta llegar a los límites de la toxicidad. Por otra, se discuten las dificultades del análisis de elementos traza y se enumeran los métodos comunmente utilizados con tal objeto. Así mismo, se hace especial hincapié en la importancia que tiene la determinación de la forma química en la que se presenta un elemento metálico y la relación de ésta con su disponibilidad y especificidad biológica. Por ello, es esencial conocer las posibilidades analíticas de las técnicas más empleadas para poder resolver estos problemas y las ventajas que representa la coexistencia de varias técnicas diferentes que proporcionen información complementaria (4-8).

II.B. DEFINICION, ESTRUCTURA Y CARACTERISTICAS DE LAS METALOTIONEINAS

II.B.1. INTRODUCCION

Cada vez se le da una mayor importancia al significado de los metales en los seres vivos.

Los iones metálicos presentes en los organismos, ya sean esenciales, tóxicos o de acción terapéutica (con excepción de los cationes alcalinos Na^+ y K^+) interaccionan con ligandos naturales presentes en aquellos (aminoácidos, péptidos, ácidos nucleicos y esencialmente proteínas), estableciéndose en muchos casos equilibrios competitivos, entre varios iones metálicos y un ligando. El primero puede dar lugar a la formación de complejos mixtos y, el segundo, al antagonismo que se establece entre algunos cationes metálicos.

Un ligando de gran importancia biológica es la tioneína, que es capaz de unirse a cationes metálicos formando compuestos mixtos, las metalotioneinas, con propiedades y características particulares.

II.B.2. INTERACCION ION METALICO-PROTEINA

Los iones metálicos pueden reaccionar con los aniones inorgánicos u orgánicos presentes en los organismos formando compuestos de gran significado biológico y fisiológico. En los seres vivos, a excepción de los cationes del grupo IA y parte de los pertenecientes al IIA, el resto de los iones metálicos se encuentran unidos, generalmente, a proteínas (9).

Las proteínas son componentes fundamentales de todo ser vivo, tanto estructurales, como funcionales; son macromoléculas orgánicas de estructura compleja, constituidas por los siguientes elementos: C, H, O, N y, en menor medida, P y S. La unidad fundamental constituyente de las mismas es un L-aminoácido que presenta, invariablemente, un grupo amino y otro ácido, a través de los cuales y, mediante un enlace peptídico, se une con otros aminoácidos para dar lugar a la cadena proteica.

Estas proteínas metálicas tienen las siguientes funciones:

- (a) Almacenamiento del ion metálico
- (b) Transporte del propio ion metálico o de otras moléculas sencillas
- (c) Acciones catalíticas (enzimas)

Un mismo ion metálico puede ejercer acciones distintas de acuerdo con la proteína a la que se une. Por otra parte, existe una relación recíproca entre el ion metálico y la proteína, ya que, por un lado, el ion metálico puede influir sobre la proteína produciendo una modificación electrónica y estructural y, por otro, la compleja estructura de la proteína puede forzar una estereoquímica no-usual para el metal, que influye en su actividad.

En general las funciones que pueden desempeñar los iones metálicos pueden corresponder a portadores de cargas (electrolitos), componentes celulares, modificadores y estabilizadores de estructuras y acciones catalíticas.

Si se tienen en cuenta ambos componentes (orgánico y metálico), en la naturaleza de la interacción metal-proteína se pueden distinguir dos grupos:

A. METALOPROTEINAS: Son complejos estables que se pueden aislar, en los que el metal está firmemente unido a la parte proteica formando un complejo con una estructura definida. Se encuentran localizados en el sitio activo, en el que tiene lugar la acción proteica. La relación proteína-metal es estequiométrica y la eliminación o inactivación del ion metálico las hace perder la actividad biológica. La actividad específica de cada proteína requiere un ion metálico determinado y se puede comprobar, mediante estudios "in vitro", que la sustitución de un metal por otro puede provocar la inactivación o una modificación en sus reacciones específicas características. Sin embargo, la acción no sólo depende del ion metálico, sino también de la parte proteica y buena prueba de ello es que un mismo ion metálico puede intervenir en diferentes estructuras proteicas con acciones diversas.

B. PROTEINAS ACTIVADAS POR METALES. Incluye a las enzimas metal dependientes. Aquí la interacción es un poco menos fuerte y sobre todo es reversible. Esto es importante para su papel catalítico.

Dentro del grupo metaloproteínas hemos de señalar un bioligando con una afinidad particularmente elevada por el cadmio, el zinc y el cobre, en su forma lábil, que es la metalotioneína, proteína de baja masa molecular relativa y alto contenido en cisteína. Como todas las proteínas azufradas, la metalotioneína sirve como ligando de cationes metálicos, se encuentra saturada con metales y puede incluir más de un catión metálico diferente.

II.B.3. METALOTIONEINAS: DESCUBRIMIENTO Y EVOLUCION CRONOLOGICA

Las metalotioneínas fueron descubiertas por Margoshes y Vallee en 1957 (10). En 1959, Vallee aisló una proteína rica en zinc y cadmio a partir de riñón de équidos, órgano que, por otra parte, se sabía que acumulaba cadmio.

Kägi y Vallee (11,12) purificaron y caracterizaron este material encontrando que esta proteína presentaba un bajo peso molecular y un elevado contenido en cisteína y cationes metálicos. Debido a su composición la denominaron metalotioneína (1960).

En 1964, Piscator (13) observó que esta metalotioneína se encontraba presente en cantidades crecientes en el hígado de los conejos que habían sido expuestos a cadmio. Postuló que la biosíntesis de esta proteína se inducía por este metal y que la metalotioneína jugaba un papel importante en los mecanismos de detoxificación metálica.

En 1966, Pulido y col. (14) indicaron que la metalotioneína también estaba presente en el ser humano. Los análisis del contenido metálico de esta proteína, aislada de riñón humano, demostraron que presentaba cadmio, zinc y cobre y que, en ciertas circunstancias, también presentaba mercurio.

En los siguientes años, sólo aparecieron nueve publicaciones y "abstracts" referentes a las metalotioneínas (10-18).

En 1972 Nordberg y col. (19) afirmaron que todas las metalotioneínas presentan al menos dos isoformas, que se pueden separar en función de sus características de carga.

Posteriormente, se hizo un compendio de todas las características que deben cumplir las metaloproteínas, para ser consideradas como metalotioneínas (20,21).

En 1978, Galdés y col., (22) enunciaron, gracias a los estudios realizados con ^1H NMR, la posible estructura de estos compuestos.

Kägi y Kojima, en 1979 (23), adoptaron las normas que unificaban la nomenclatura de las metalotioneínas y sus isoformas.

También en 1979, Webb (24) identifica las secuencias características de las metalotioneínas, y establece el tipo de unión metal-tioneína $(\text{M}^{2+}(\text{Cys}^-)_3)^-$. Weser y Rupp, en estudios análogos con las cobre-tioneínas, identifican el estado de oxidación del metal, Cu(I) , y el tipo de unión $(\text{Cu}^+(\text{Cys}^-)_4)^-$.

En 1980, Otvos y Armitage (25), enuncian la existencia de 2 racimos ("Clusters") en la proteína, denominados "Cluster A" y "Cluster B", que son capaces de complejar 4 y 3 cationes metálicos divalentes, respectivamente.

También en 1980, Suzuki y col. (26), y Minkel y col. (27) observan la formación de dímeros de metalotioneína, producidos mediante la formación de puentes disulfuro intermoleculares e identificados mediante cromatografía de exclusión.

En 1982, Briggs y Armitage (28) comprueban que los dos "clusters" existentes en la molécula presentan diferente afinidad por los metales, el "A" es mas afín por el cadmio y el "B" lo es por el cobre.

Nielson y Winge, en 1983 (29), establecen, gracias a los estudios con RMN, que la unión de los cationes a la proteína no se efectúa al azar.

En 1984 se consiguen aislar al menos 5 isoformas de cada tioneína (30).

En 1985, Nielson y col. (31) establecen las afinidades relativas de diferentes cationes asociados a las metalotioneínas.

En 1986, Braun y col. (32), gracias a la RMN asociada a un tratamiento informático, muestran la primera representación tridimensional de las metalotioneínas.

En los últimos años existe un número muy importante de trabajos orientados a profundizar en el conocimiento de las características de las metalotioneínas, de sus propiedades y papel en los seres vivos.

II.B.4. METALOTIONEINA: DEFINICION, NOMENCLATURA Y PRESENCIA EN LA NATURALEZA

II.B.4.A. DEFINICION

Historicamente, la primera definición del término "metalotioneína" se ha utilizado para designar a las proteínas, ricas en cisteínas y, por tanto, con grupos tiólicos que contenían zinc, cadmio y cobre, procedentes de corteza renal de équidos (11).

Esta proteína se caracteriza (20,21):

- peso molecular: 6000-7000, cuando se deduce a partir del análisis de secuenciación aminoacídica
- alto contenido metálico
- composición aminoacídica característica: elevado contenido en cisteína y ausencia de aminoácidos aromáticos y de histidina
- características ópticas de los tiolatos metálicos (mercapto)
- una única secuencia aminoacídica (distribución fija de los residuos de cisteína).

Las proteínas de características similares pueden ser designadas como "metalotioneínas".

Existen además otras características:

- están localizadas principalmente en el citoplasma de tejidos parenquimatosos
- ausentes en los fluidos biológicos
- ausencia de enlaces disulfuro
- la presencia de los metales en dos "clusters" diferentes
- es una molécula genéticamente inducible, la síntesis de tioneína se ve inducida por ciertos

metales, hormonas y diferentes condiciones de "stress"

- es estable al calor
- presenta una baja antigenicidad localizada toda en el fragmento beta que dará lugar al "cluster B" (33,34)

II.B.4.B. NOMENCLATURA

La terminología utilizada para las diferentes metalotioneínas y sus derivados ha sido confusa (23). Esta se ha normalizado basándose en la amplia información, ahora disponible, sobre la composición y estructura de estas proteínas.

Nomenclatura de la metalotioneína

- El término "metalotioneína" debe utilizarse para todas las proteínas que se ajusten a la definición precedente.

- El término "tioneína" se debe de usar sólo cuando se especifica la apoproteína (metalotioneína sin cationes metálicos) de la metalotioneína. También puede utilizarse el término "apometalotioneína" para especificar a la apotioneína.

- Los términos más específicos como el de "cadmio-metalotioneína" y "cadmio-tioneína" pueden utilizarse cuando la metalotioneína contenga solamente cadmio. Para metalotioneínas que contengan otro metal, se usará una nomenclatura análoga. El metal que anteceda a la palabra "tioneína" debe ser el que se haya utilizado para inducir la síntesis de la metalotioneína.

- Cuando la metalotioneína contenga mas de un metal se pueden utilizar términos como "(cadmio, zinc)-tioneína" e incluso indicar el número de átomos de cada metal como subíndice. La secuencia en la que los metales se enumeran estará en función de su abundancia.

- En casos en que no se pueda especificar la composición metálica, bien porque no se conozca o porque no sea de interés, puede utilizarse el término "metalotioneína".

Nomenclatura de las múltiples formas de las metalotioneínas

La nomenclatura adoptada se basa en las recomendaciones de la IUPAC (35).

- El término "múltiples formas de metalotioneínas" o "isometalotioneínas" debe utilizarse como un término amplio que cubra todas las metalotioneínas presentes de forma natural en cada especie. Estos términos deben aplicarse solamente a las formas de metalotioneínas que aparecen como consecuencia de determinadas diferencias en la estructura primaria y no a formas derivadas por modificación de la misma secuencia primaria o a formas que difieren sólo en la composición metálica.

- Para las isometalotioneínas se debe utilizar el término "metalotioneína" seguido de un número. Cuando existan modelos complejos de isometalotioneínas, debe utilizarse el número para designar el principal grupo y letras como subíndices para subformas individuales separadas por procesos adicionales (1a, 1b, 1c; 2a, 2b, etc.).

- En casos donde la clasificación puede basarse en el tipo de secuencia aminoacídica, se recomienda un código de letras griegas para designar la cadena.

II.B.4.C. PRESENCIA EN LA NATURALEZA

La presencia de MT se ha puesto de manifiesto en gran parte de organismos vivos, lo que ha llevado a suponer que esta molécula forma parte de la vida y que su gen codificador ha ido evolucionando con las especies (36). Se ha descrito (37) su clasificación en diferentes organismos vertebrados, así como, en varios casos, la composición aminoacídica y su secuencia. Así mismo, se ha detectado la presencia de MT en teleósteos (38-40). Ciertos metales inducen su biosíntesis (21,24,41-47), incluso en cultivos celulares (48).

Con respecto a los invertebrados, parece evidente que la MT se produce en varios "phylum"; se ha caracterizado tanto en crustáceos (36,49,50) y moluscos (36, 51-53), como en otros invertebrados marinos (54,55) y en la lombriz de tierra (56). Estas metalotioneínas son análogas a las aisladas de vertebrados (57).

También se han identificado MT en microorganismos tales como "*Saccharomyces cerevisiae*" (58), "*Neurospora crassa*" (59-61) y "*Anacystus nidulans*" (40,62). Por otra parte, se ha puesto de manifiesto la posibilidad de producir proteínas, análogas a las MTs, de ciertas bacterias (63).

Esta proteína no se encuentra exclusivamente en el reino animal, puesto que se ha demostrado su existencia en "agrostis" (64) y en raíces de tomate (65).

II.B.5. CARACTERISTICAS DE MT

II.B.5.A. DETERMINACION DE LA MASA MOLECULAR RELATIVA

Las técnicas más utilizadas en la determinación del peso molecular de las MT son la cromatografía de filtración en geles, el equilibrio de sedimentación y el análisis de la secuencia de aminoácidos. El valor del peso molecular depende la técnica empleada y la propia procedencia de la MT.

La mayoría de las MT de mamíferos contienen aproximadamente 60 aminoácidos, lo que implica que el peso molecular relativo está comprendido entre 6000 y 7000 daltons (19-21). Cuando se determina mediante cromatografía de filtración en geles (12) el peso molecular es considerablemente superior al anterior, próximo a los 10000 D. Estas diferencias se atribuyen a la forma no globular de la MT (66-68); sin embargo, por cromatografía de filtración de geles de la apometalotioneína oxidada en presencia de guanidina o de urea, se encuentran pesos moleculares que concuerdan con los determinados a partir de datos de secuenciación (69,70).

En ciertos casos de exposición muy elevada de un organismo a metales pesados, se ha aislado un dímero de MT con un peso molecular de unos 14000 D (26,27) que tratado con un agente reductor se transforma en monómero. La cantidad de catión metálico asociado al dímero es menor que la correspondiente a dos moléculas de monómero, ya que parte de los azufres tiólicos forman puentes disulfuro (71). Las MT más susceptibles de dimerizarse son las de cobre y zinc.

Por otra parte, se ha comprobado que las MT de invertebrados son algo menores que las de mamíferos (50). Así, las MT de levaduras contienen sólo 57 aminoácidos, por lo que su peso molecular es menor y las MT fúngicas que presentan un peso molecular de unos 2600 D.

II.A.5.B. ESTRUCTURA DE LAS MT

Composición y secuencia aminoacídica

La composición aminoacídica de las MT se caracteriza por la preponderancia de los residuos de cisteína y la virtual ausencia de aminoácidos aromáticos (66). El contenido de serina varía entre 7-17% y el de lisina entre 10-15% (24). No están presentes la histidina, la leucina y la isoleucina (21), aunque se ha indicado la presencia de un único residuo de histidina en las MT procedentes de pollo; análogamente la leucina y la isoleucina pueden existir en pequeña cantidad. La valina está presente sólo en algunas MT de mamíferos (20,69,72-74).

En los últimos años se han logrado considerables avances en relación con determinación de la estructura primaria de las metalotioneínas aisladas a partir de diferentes especies (21,36,41,50,75-79). Todas las secuencias aminoacídicas de las MT de mamíferos presentan acetil-metionina como aminoácido N-terminal y alanina como aminoácido C-terminal (21). La metionina parece ser el iniciador de la biosíntesis de esta proteína (69). Sin embargo, las MT procedentes de cangrejos y de la "*Neurospora crassa*" carecen de este aminoácido que se puede haber perdido en procesos de purificación (60,78).

Un hecho importante en la estructura primaria de las MT es la notable similitud estructural en la secuencia aminoacídica. En efecto, las posiciones ocupadas por cisteínas se conservan fijas (21,41,79-81) y se pueden observar en la figura-1 un alineamiento en dichas posiciones independiente de la longitud de la cadena, compartidas por las 7 unidades de cisteína de la "*Neurospora crassa*" y 20 de las de mamíferos (50). Además de la cisteína existen otros aminoácidos que parecen conservar invariables sus posiciones en las MT de diferente origen (57). La similitud de la secuencia de aminoácidos en gran parte de las MT aisladas de diferente procedencia se estima entre un 75

	1	10	20	30	40	50	60
Human MT-1	AC-M D P N C	S C A P G S V	C T A C A G S C K C T E	- C K C T S C R K S C C S	C C P V G C A K C A Q G C	I C K G (A, S) D K	- C S C C A-OH
Human MT-2	AC-M D P N C	S C A A G D S	C T C A G S C K C K E	- C K C T S C K K S C C S	C C P V G C A K C A Q G C	I C K G A B D K	- C S C C A-OH
Equine MT-1A	AG-M D P N C	S C P T G G S	C T C A G S C K C K E	- C R C T S C K K S C C S	C C P G G C A R C A Q G C	V C K G A S D K	- C S C C A-OH
Equine MT-1B	AC-M D P N C	S C V A G E S	C T C A G S C K C K Q	- C R C A S C K K S C C S	C C P V G C A K C A Q G C	V C K G A S D K	- C S C C A-OH
Rabbit MT-2	X-M D P N C	S C A A D G (S	C T C A, T, S C K C K A	- C K C T S C K K S C C S	C C P S G C A K C A Q G C	I C K G A S D K	- C S C C A-OH
Mouse MT-1	AC-M D P N C	S C S T G G S	C T C T S S C A C K H	- C K C T S C K K S C C S	C C P V G C S K C A Q G C	V C K G A A D K	- C T C C A-OH
Mouse MT-2	AC-M D P N C	S C A S D G S	C S C A G A C K C K Q	- C K C T S C K K S C C S	C C P V G C A K C S Q G C	I C K Q A S D K	- C S C C A-OH
Rat MT-1	X-M D P N C	S C S T G G S	C T C T S S C A C K N	- C K C ... (Partial sequence)			
Rat MT-2	AC-M D P N C	S C A T D G S	C S C A G S C K C K Q	- C K C T S C K K S C C S	C C P ... (Partial sequence)		
Plaice	AC-M D P	- C E C S K T G T	C N C G G (S) C T C K N	- C G C T ... (Partial sequence)K	- C T C C Q-OH
Scylla MT-1	P G P C	- C - - N D K C V C K E G	- G C K E G C O C T S	C R C S P C E K C S S G	C - K C A N K E E	C S K T C S K A	C S C C P T-OH
" MT-2	P D P C	- C - - N D K C D C K E G	- E C K T G C K C T S	C R C P P C E O C S E G	C - K C A N K E D	C R K T C S K P	C S C C P-OH
Neurospora MT	H-G D C G	C S G A S S C N	C G S G C S C S H	- C G S R-OH			

FIGURA 1. Estructura primaria de algunas metalotioneínas (102).

y un 90% (30), aunque esta comparación no es fácil debido a la presencia de múltiples formas de MT. Es digno de mención que las secuencias aminoacídicas invariables se encuentran en ciertas regiones de la molécula, en las posiciones 1 a 7, 28 a 38 y 56 a 61. Aunque no se conoce con exactitud el papel que desempeñan estas secuencias comunes, se ha hecho la hipótesis de que los requerimientos estructurales para fijar cationes metálicos y mantener una conformación particular de la cadena polipeptídica podían ser un factor importante. Desde el punto de vista evolutivo, si se comparan las secuencias de la cadena de diferentes MT de mamíferos se observa que las sustituciones de un aminoácido por otro diferente están confinadas en áreas específicas de la cadena polipeptídica. Se ha observado que en la mitad amino-terminal las posiciones de sustitución son de la 8 a 11, la 14 y la 23 y en la mitad carboxi-terminal las 39 y 54 (79,82).

En cuanto a las secuencias de aminoácidos que contienen varios grupos cisteína (cys), la mayor parte de las MT de mamíferos contienen tres veces la secuencia -cys-cys-, siete veces la secuencia -cys-x-cys- y tres la -cys-x-y-cys-, en donde "x" e "y" representan aminoácidos diferentes de la cisteína (24). Las MT de cangrejo y de "*Neurospora crassa*" repiten la secuencia tripeptídica solamente tres veces (82). La figura 2 ilustra el modo de distribución de los residuos de cisteína en las MT procedentes de mamíferos.

La segunda característica destacable de la cadena de las metalotioneínas se obtuvo al comparar las secuencias de aminoácidos de MT de mamíferos y de no-mamíferos, ya que se observó que los aminoácidos básicos, lisina y arginina y, en algunos casos, la serina, están unidos con la cisteína, como muestra el hecho de que siete de los ocho residuos básicos de la cadena ocupen posiciones directamente adyacentes a la cisteína: 4 -cys-lys-, 1 -cys-arg- y 3 -lys-cys- (21). La posición central de la cadena contiene casi exclusivamente estos aminoácidos. La función de estos aminoácidos parece ser la de compensar el exceso

de cargas negativas generadas en la cadena cuando se forman los complejos proteína-cation metálico.

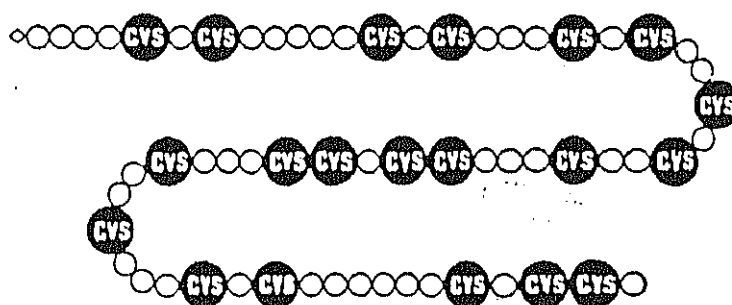


Figura 2. Distribución de los residuos de cisteína en la cadena proteica de MT de mamíferos (82)

Posiciones de enlace al catión y configuración espacial

La apotioneína, obtenida por disminución del pH, posee una estructura desordenada, aunque esta forma es muy difícil que se presente en los organismos, por la abundancia de iones positivos que presentan en su medio interno (83,84).

Las metalotioneínas presentan, en su estado natural una estructura espacial bien definida (85,86). La constancia de una única forma molecular de la MT, semejante a una elipsoide de prolato, se avala por los diferentes estudios realizados sobre este tema con el empleo de técnicas muy variadas, específicas de determinación de estructuras y otras más generales. Entre ellos se pueden citar como más importantes la espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN), bien protónica ^1H RMN (22,31,87-89) o multinuclear ^{113}Cd (90,91) u otras (92,93), microscopía electrónica de campo oscuro (70,94), medidas por EXAFS -espectroscopía fotoelectrónica de RX- (45,72,95-97), medidas de correlación angular perturbadas y espectrometría UV

(98-100). Los resultados obtenidos por otros métodos mas convencionales, también concuerdan con la existencia de una estructura conformacional rígida de las MT, como, por ejemplo las medidas por análisis de sedimentación y filtración de geles (20), el intercambio lento de algunos hidrógenos peptídicos con el disolvente (22,88,101), por su resistencia a la digestión enzimática (102-104) y la desnaturalización por calor (72,105). Sin embargo, parece que la fuerza iónica del medio en que se encuentra disuelta influye en las dimensiones de la estructura molecular (68). La estructura secundaria no se corresponde con la típica α -hélice o la lámina plegada (30,83,84,89,92).

Con respecto al enlace catión-proteína, ya que las MT contienen veinte residuos de cisteína y aproximadamente siete átomos gramo de iones metálicos divalentes ligados, se pensó inicialmente que cada átomo de metal estaba ligado a tres residuos de cisteína, lo que parecía confirmarse por el hecho de que cuando se disminuía el pH eran necesarios 3 H^+ para desplazar a cada uno de los cationes (12,102) y que la adición de cationes metálicos a la apotioneína provoca la desprotonación de los grupos tiol de las cisteínas (72). Se propuso que el catión estaba, por lo tanto, ligado a residuos de cisteína formando complejos del tipo $M^{2+}[(Cys^-)_3]^-$, (24) en los cuales el sitio primario de unión era bidentado y correspondía a las secuencias aminoacídicas -Cys-x-Cys- y la posterior interacción del metal con un tercer residuo de cisteína como se indica en el esquema correspondiente a la figura 3. Se suponía en este caso que los enlaces con el catión eran independientes unos de otros (106).

En el caso de que el grado de oxidación del catión que se enlace sea (I), se puede tomar como ejemplo la Cu-T. La estequiometría es 1:2 y corresponde a la fórmula $[Cu^+(Cys^-)_2]^-$ que presenta una gran estabilidad frente al pH, pero que se oxida fácilmente con alteración de los grupos tiol (95).

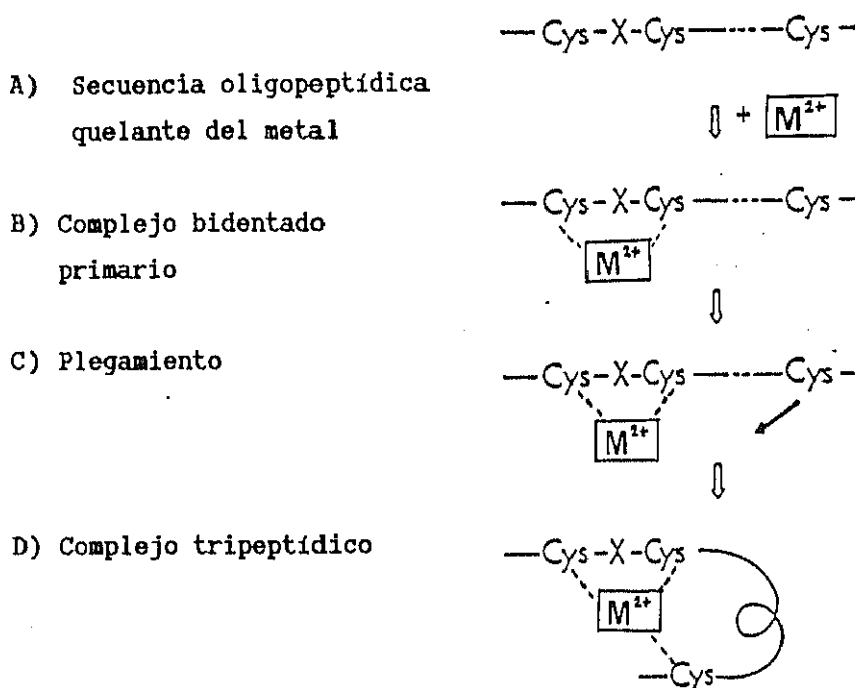


Figura 3. Mecanismo de unión del catión en la MT (3).

Los avances más significativos a la hora de comprender la geometría de coordinación de los metales en las MT y la estructura de las posiciones de enlace con el catión se deben, como se ha indicado a la utilización de la técnica ^{113}Cd -RMN (91). Las MT aisladas a partir de varias fuentes, incluidas las invertebradas, se estudian actualmente mediante esta técnica y, a partir de estos análisis, se ha señalado la existencia de "clusters" metálicos polinucleares en la proteína.

Se sabe actualmente que la metalotioneína presenta una estructura compacta y se ha establecido que los metales ligados a las MT se distribuyen en dos "clusters": Cluster A y Cluster B. En el caso de iones metálicos divalentes se encuentran cuatro iones en el "cluster A" y tres en el "cluster B" (25,80,91). En el caso de metales monovalentes, cada uno de los "clusters" contiene seis iones (107). Se han obtenido fragmentos de MT que contenían ambos tipos de agrupamientos a partir de proteína previamente tratada con EDTA, seguido de proteólisis (29,108,109). El "cluster A" parece que corresponde al dominio alfa de la apotioneína, que va desde el aminoácido 32 al 61 y,

por tanto, incluye el aminoácido carboxi-terminal; el "cluster B", que corresponde al dominio beta, incluye los aminoácidos del 1 (aminoácido amino-terminal) aminoácido 26. El fragmento polipeptídico 27 al 31 parece ser el segmento bisagra que une ambos dominios (110). En el "cluster A" existen once cisteínas, cinco de las cuales actúan formando puentes tiolato entre los cuatro cationes, en el "cluster B" existen nueve cisteínas y tres puentes tiolato. La estructura corresponde al siguiente esquema (fig.4):

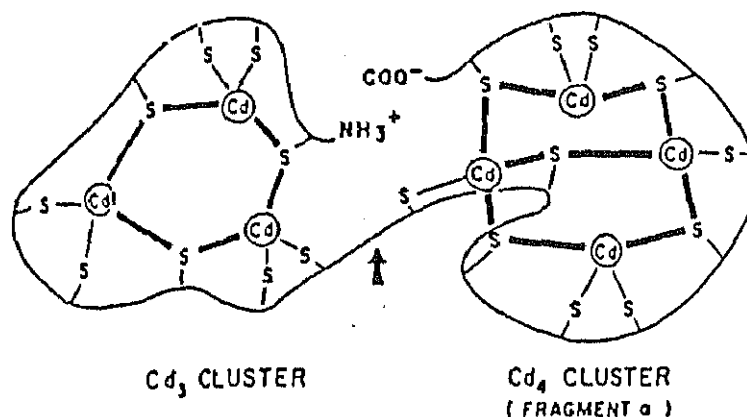


Fig.4. Representación esquemática de la estructura de una Cd₇T (19)

Mediante espectroscopía de RMN, geometría de distancias y cálculos informatizados se ha podido obtener una imagen tridimensional válida para las Cd-T (32,111), en la cual se observan los 2 clusters. Como puede verse en la figura 5 la disposición espacial de la cadena se debe a que los aminoácidos "x" e "y" de los fragmentos -cys-x-cys- y de los -cys-x-y-cys- permiten la rotación de la cadena y la posibilidad de orientarse en todas las direcciones del espacio.

Parece ser que ambos "clusters" presentan diferente afinidad por un metal dado. El "cluster A" presenta mayor afinidad por el cadmio, mientras que el "cluster B" la tiene por el cobre

(28,34,107). En efecto cuando se reconstituye una apotioneína con cadmio, la unión comienza en el dominio alfa, mientras que si se hace con cobre, éste comienza a ligarse a los grupos tiólicos del dominio beta.

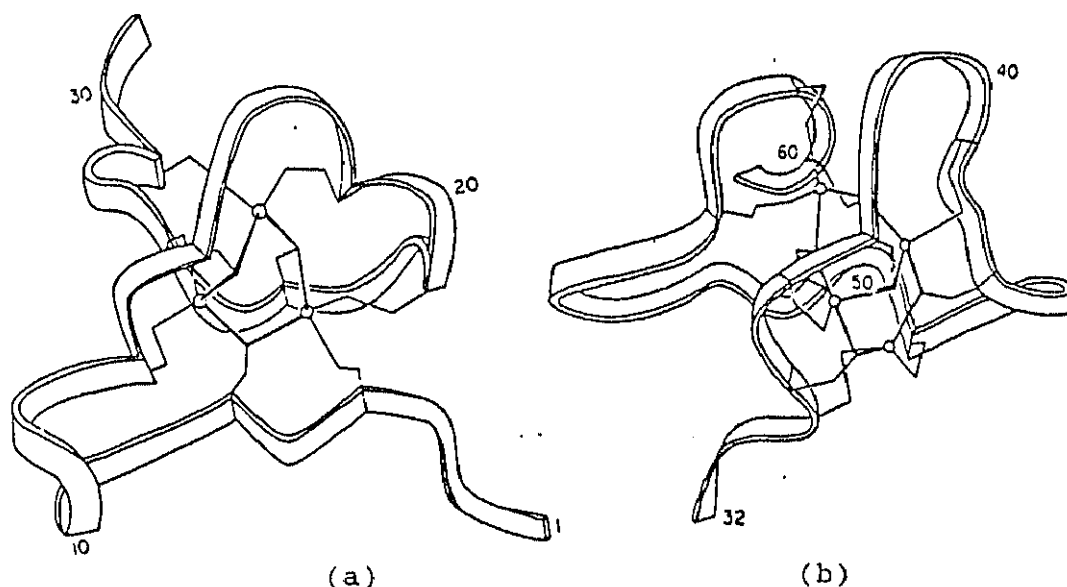


Figura 5. Representación tridimensional de los dos dominios de la MT. (a)"cluster B" y (b)"cluster A" (122).

Otros estudios realizados (29) sobre la reconstitución de los complejos tioneína-catión metálico indican cierta reversibilidad del sistema y que las uniones deben ser específicas. La adición de Cd^{2+} y Zn^{2+} , en cantidades menores a las de saturación indica que la unión se realiza de forma ordenada, en un proceso bifásico, en el que comienza llenándose, en primer lugar, el "cluster A", no mediante enlaces al azar, con el catión que presenta mayor afinidad por la tioneína, en este caso el cadmio. Otro hecho a destacar es que la unión al catión presenta un carácter inductivo, es decir, la unión del primer catión facilita que se complete este "cluster", intermedio cinética y termodinámicamente estable (108), seguido inmediatamente del enlace con el fragmento B en una molécula dada. La unión de los cuatro primeros cationes al fragmento α proporciona la configuración necesaria para que se puedan ligar

los tres cationes restantes, aunque no existe inducción entre ambos agrupamientos (31,80,112). La estructura final de una MT inducida por cadmio estará prácticamente saturada con cadmio y los pocos cationes Zn(II) que porte irán en el "cluster" B (108,109).

La reversibilidad del proceso se manifiesta por el orden de desplazamiento de los cationes, bien por otros de mayor afinidad o por los iones hidrógeno procedentes de un ácido, primero se vacía el "cluster" B y luego lo hace el A (83).

El fenómeno descrito no se reproduce con todo tipo de cationes. Así, la reconstitución de ciertas metalotioneinas con Co^{3+} se realiza al azar (112), los cuatro primeros cationes se distribuyen entre los dos "cluster". La reconstitución con sales de Cu(I) (109) indican que el fragmento B se satura preferentemente que el dominio α .

En conclusión se puede indicar que la proteína presenta dos tipos de configuración (31,100) diferentes en función de su coordinación al metal. La mayoría de los metales divalentes y trivalentes saturan la proteína como $\text{M}_7\text{-T}$ (70). Por ejemplo: Bi(III), Cd(II), Co(II), Hg(II), In(III), Ni(II), Pb(II), Sb(III) y Zn(II). Los monovalentes como: Ag(I), Pt(I) y Au(I) lo hacen en la forma $\text{M}_{11}\text{-T}$. El diferente contenido metálico, así como el tipo de metal que interviene en el enlace se manifiesta en una diferente geometría de coordinación (31,34,83,,91,113-115) como, por ejemplo:

- coordinación $\text{M}_7\text{-T}$
 - Zn: tetraedro regular
 - Cd, Hg: tetraedro distorsionado, casi cuadrado plana
- coordinación $\text{M}_{11}\text{-T}$
 - Cu(I), Ag(I), Hg(II) en exceso: lineal

Un ejemplo claro de la influencia del contenido metálico lo proporciona el Hg-T (114) que varía su geometría de coordinación

desde tetraédrica distorsionada a lineal, si varía la cantidad de mercurio de 7 a 12 át.g/mol T.

La diferente estructura espacial, a su vez, parece estar relacionada con el número y naturaleza de los cationes que se asocian así, como con las diferentes funciones que puede presentar la metalotioneína en el organismo: metabolismo, homeostasis y destoxificación de los cationes metálicos, a la vez que sirve para diferenciarlas, ya que en función de la estructura espacial presentarán una diferente absorción intestinal, almacenamiento intracelular, transporte o excrección.

Enlace metal-tioneína: Afinidad de los cationes metálicos

Una importante propiedad de la tioneína es su capacidad para ligar cationes metálicos, tanto "in vivo" como "in vitro", en particular los elementos de transición (31,66,79,97,107, 116).

Tabla 1. Elementos asociados a las Metalotioneínas, y estado de oxidación en que se unen.

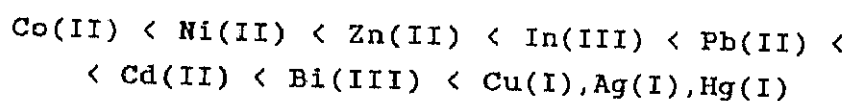
VIIB	VIII	VIII	VIII	IB	IIB	IIIA	IVA	VA
	Fe 2, 3	Co 2	Ni 2	Cu 1	Zn 2			
	Ru 3	Rh 3	Pd 2	Ag 1	Cd 2	In 3		Sb 3
Re 5	Os 3		Pt 1, 4	Au 1	Hg 2, 1	Tl 3, 1	Pb 2	Bi 3

La tabla 1 presenta una tabla que ilustra dicha posibilidad y en ella se indica el grado de oxidación del catión metálico en el enlace. Se observa que la mayor parte de los cationes se unen con grado de oxidación 2 y que es menos frecuente es el grado de oxidación 1.

La cantidad de ion unido a la proteína depende de la naturaleza del propio catión y de la procedencia de la MT. En MT de gran cadena, procedentes de mamíferos, para cationes divalentes (19,20,69,87,102,117) existen 7 átomos gramo por mol de MT y 12 átomos gramo para los monovalentes (83,118,119). En el caso de la Ag-T se han encontrado 20 átomos gramo de catión por mol de proteína, aunque el nivel de saturación es de 12 (31). Proteínas mas pequeñas como la Cu-T de "Neurospora crassa" o de levadura unen 6 y 8 átomos gramo de cobre(I) respectivamente (34,60).

La afinidad relativa del catión metálico por la proteína se ha determinado por desplazamiento de un catión dado previamente ligado a la tioneína por otros cationes en un proceso de incubación, por medida de la resistencia de la metalotioneína, ligada a un metal dado, a la proteólisis, por adición de un agente quelante tal como el EDTA que forma complejos estables con el catión o por protonación de los grupos iónicos de la proteína por disminución del pH (11,12,15,31,66,72,83,100,102,103,116).

La afinidad de los iones más importantes que se pueden unir a la metalotioneína (11,12,31,100,103) aumenta en el orden siguiente:



El pH al cual el 50% del metal se encuentra disociado en la MT se indica en la tabla 2:

Tabla 2. Valores de pH, para diferentes elementos al cual se encuentran disociado el 50% del metal de su unión a MT

CATION	Cu(I)	Cd(II)	In(III) Sb(II) Pb(II) Ru(III)	Zn(II)	Ni(II)	Co(II)
pH	2.7	3.7	4.4	4.8	5.7	5.8

De acuerdo con el orden anterior, cuanto mayor es la afinidad del catión más bajo es el pH al que se produce la disociación del complejo.

Isometalotioneinas. Aislamiento y separación

Debido a la diferencia de composición o secuencia de la cadena polipeptídica, a los enlaces con diferentes cationes metálicos o, incluso, a la distribución espacial se han detectado diferentes formas de una misma MT que se denominan, de manera general, isoMT (66). Estos compuestos pueden presentar diferencias en sus propiedades físico-químicas lo que permite su separación.

Aunque las posiciones ocupadas por las cisteínas, las serinas y los aminoácidos básicos adyacentes son invariables, se ha demostrado que las iso-MT difieren entre sí en la estructura primaria, seguramente debido a que su síntesis está codificada por diferentes cistrones (79,121). Estas variaciones en la secuencia aminoacídica hacen que algunas características puedan ser diferentes. Sin embargo, no son lo suficientemente significativas para que su peso molecular varíe (116,122,123) y dificulta la obtención de anticuerpos específicos para cada una de las isoMT. Las isoMT presentan diferente afinidad por los cationes metálicos (11,33,35,36,42,57) y hace que la velocidad de recambio "in vivo" sea distinta para cada una de ellas (116).

Una consecuencia de esta diferente afinidad por los metales y su diferente composición aminoacídica se pone de manifiesto en las diferencias que se producen en los espectros UV (124). El desplazamiento de los cationes por EDTA también depende del tipo de isoforma (108).

Su biosíntesis se induce en diferente proporción, no sólo en función del órgano estudiado (108) sino también, según el catión metálico que la produzca (113) u otros agentes inductores (125), lo que ha llevado a pensar, aunque sin demostrarlo, que las isoMT pueden presentar funciones biológicas diferentes.

Además de las dos principales isoformas, existen variantes alélicas polimórficas en el hombre, caballo y conejo, que tan sólo difieren en una de sus bases, es decir, han surgido como consecuencia de una mutación puntual.

Los procesos de separación se basan en la diferencia de propiedades. Se incluye el fraccionamiento mediante sales y/o disolventes orgánicos, tratamientos térmicos, filtración en geles, diferentes tipos de cromatografía y más recientemente el isoelectroenfoque. Para prevenir pérdidas de metal, todos los procesos cromatográficos de separación se deben realizar a un pH cercano a la neutralidad. También se debe evitar la autooxidación (26,27), sobre todo en el caso de Cu-T (42,45,46,71) y se ha propuesto el uso de mercaptoetanol como aditivo durante el proceso de preparación (72).

Entre las primeras observaciones sobre la existencia de diferentes formas de MT, por cromatografía y electroforesis, se pueden citar los trabajos de Piscator (13) y Pulido y col. (8). En los estudios mas antiguos se utilizaban técnicas de separación basadas en las propiedades de carga (12,14,19,20,126,127). Por cromatografía de intercambio iónico y por electroforesis se ha demostrado (121) que la mayoría de las MT presentan, al menos, dos isoformas que se denominaron MT-I y MT-II debido al orden de elucción en un intercambio aniónico (24). Recientemente se ha

propuesto la separación por HPLC en fase reversa debido a la diferencia de hidrofobicidad (79). En todos los tejidos de mamíferos se encuentran las dos isoformas (36,128) y, en algunos casos se han conseguido identificar y separar 5 y 6 diferentes isoformas (83). Las formas variantes de las MT no pueden separarse en todos los casos, pero se muestra su existencia por el análisis de secuenciación de aminoácidos (75,77,78,128).

II.B.5.C. COMPORTAMIENTO EN FUNCION DEL pH

Las metalotioneínas, como cualquier proteína, presentan numerosos grupos ionizables pertenecientes a cada uno de los aminoácidos que la constituyen. Estos grupos son principalmente los carboxílicos ($-\text{COOH}$), los amínicos ($-\text{NH}_2$), hidroxílicos alifáticos ($-\text{OH}$), hidroxílicos fenólicos ($\text{Ph}-\text{OH}$), amídicos ($-\text{COONH}_2$) y tiólicos ($-\text{SH}$). Las MT debido a su composición característica presentan fundamentalmente los grupos tiólicos y amínicos procedente, respectivamente, de las cisteínas y los aminoácidos básicos. Debido a esta composición todas las MT de mamíferos, caracterizadas hasta el momento, presentan carga negativa, aproximadamente 1.89, a pH neutros (12,129). Los puntos isoeléctricos, pH al cual la proteína presenta carga neta igual a cero, varían entre 3.9 y 5.5 (12, 19,24,117,130), en función del contenido en lisinas y la composición metálica, por lo que variará, no sólo con la especie sino también, en las diferentes isoMT.

Cuando se disminuye el pH, los cationes unidos a la proteína se liberan (11,12,83,84,95) produciéndose, como ya se ha indicado anteriormente, la apotioneína. El pH al cual el 50% del catión está disociado depende de la concentración y del catión involucrado en el enlace.

La apotioneína es estable a valores bajos de pH, pero se polimeriza rápidamente con formación de puentes disulfuro cuando se reajusta el pH hasta pH neutro, en ausencia de metales (72).

Se han realizado numerosos estudios para calcular los valores de los pK de disociación (15,31,102,131). El primero de los cuales se realizó mediante espectrofotometría UV en un amplio intervalo de pH que iba desde valores ácidos a neutros. Sin embargo, generalmente lo que se realiza son estudios comparativos que nos proporcionan información sobre la afinidad relativa de los distintos metales por la MT, por desplazamiento de un metal asociado a un agente quelante (EDTA) por la MT o, por la resistencia en función del pH que presentan las diferentes MT a la acción proteolítica de ciertas enzimas. Las constantes de asociación así calculadas oscilan entre 10^{19} - 10^{18} para el cobre, 10^{17} - 10^{15} para el cadmio, 10^{14} - 10^{11} para el zinc.

II.B.5.D. COMPORTAMIENTO ESPECTROSCOPICO

La mayor parte de los métodos ópticos y espectrométricos se han empleado para la elucidación de la estructura de la MT, como ya se ha indicado en el apartado correspondiente. Los mismos metales se pueden utilizar, así mismo, para la determinación cuantitativa y para el estudio de su comportamiento en función de diferentes parámetros.

La espectrofotometría UV permite obtener espectros de absorción que reflejan tanto la composición aminoacídica como la metálica (3,11,12,19,24,30,45,66,72,83,87,95,102,112,117,122,133-140). De acuerdo con la ausencia de aminoácidos aromáticos en su estructura, las MT no presentan absorción a 280 nm. Se observa, sin embargo, una banda de absorción bien definida, con un máximo entre 190-210 nm, que puede ser atribuida a las transiciones de los enlaces amida de la cadena polipeptídica. Para longitudes de onda más elevadas se obtiene una amplia banda de absorción, del tipo de transferencia de carga, típica de los complejos catión-tiolato (138,139,140). Esta absorción se manifiesta como hombros en la región comprendida entre 220 y 400 nm y depende de la naturaleza del catión asociado a la proteína y del pH. Cuando,

a pH ácido, se liberan los cationes de sus enlaces con el compuesto orgánico, estas bandas desaparecen.

Una síntesis bibliográfica más extensa y detallada de los trabajos realizados por espectrofotometría UV se presentará en el capítulo correspondiente al estudio espectrofotométrico de MT (Cap. IV) de esta memoria.

Las MT que contienen cobre presentan una luminiscencia característica cuando se las irradia con luz UV (122,141,142). Se sugirió que las propiedades espectrofluorimétricas eran debidas a transiciones del tipo transferencia de carga de los complejos Cu-tiolato (141).

La unión del metal también induce una actividad óptica y un dicroísmo circular característico, lo que indica una coordinación asimétrica (14,16,72,83,84).

II.B.6. PAPEL DE LAS MT EN EL METABOLISMO

II.B.6.A. BIOSINTESIS: INDUCCION E INHIBICION

Se puede inducir la síntesis de las MT por diferentes agentes. Los inductores mas importantes se han agrupado en el siguiente esquema (tabla 3).

Tabla 3. Inductores de las metalotioneinas. Extraida de: (143)

INDUCTORES DE LAS METALOTIONEINAS
<p>Inductores directos:</p> <p>Metales pesados (Cd^{2+}, Zn^{2+}, Cu^{2+}, Hg^{2+}, Co^{2+}, Pb^{2+}, Ni^{+}, Bi^{2+}, Ag^{+}), Glucocorticoides, Progesterona Catecolaminas, Glucagon, Interleukina I, Interferon, Esteres de forbol, Iodo acetato</p> <p>Inductores indirectos:</p> <p>Tetracloruro de carbono Etanol, uretano, plomo y manganeso</p>

Después de que Piscator (13) demostrara que se producía un aumento de los niveles hepáticos de las MT en animales expuestos a Cd, numerosos estudios demuestran que la administración de algunos cationes pesados aumenta la síntesis de MT (75,144-153). Actualmente se admite el hecho de que la administración de metales activa los genes de MT que incrementan la producción de su m-ARN (146-156). Como diferentes pueden inducir preferentemente una de las iso-MT, el estudio de esta inducción permite obtener información de las funciones que desempeñan las mismas.

Junto con los metales, existen otros agentes que inducen la síntesis de las metalotioneínas. Por ejemplo, el glucocorticoide sintético dexametasona, activa los genes para la MT, tanto "in vivo" como en cultivos celulares (147).

Por otra parte, las condiciones de "stress", por ejemplo, la desnutrición, las infecciones, el ejercicio, la exposición al calor y frío, también inducen la síntesis de las MT (75,157). En este caso, parece que el mecanismo de inducción es diferente del propuesto para glucocorticoides (154). Otros agentes también inducen la síntesis de las MT (48,158-161).

Otros agentes, tales como la actinomicina D, cordicepina y cicloheximida, producen el efecto contrario en la síntesis de las MT, es decir, provocan su inhibición. Diferentes trabajos se han orientado al estudio de las MT de cadmio y de zinc (75,149-151, 162-164), otros hacia las de cobre que presentan un comportamiento diferente (165-166), o incluso a las inducidas por otros cationes como el mercurio (167-169). Así por ejemplo, si se administra uno de los agentes mencionados, como la cicloheximida, a animales previamente a la inyección hepática de sales de cadmio o zinc, bloquean la inducción de la síntesis hepática de las MT, pero si estos agentes se administran después que las sales de los metales la inhibición no se produce. Sin embargo, en el caso del cobre la inhibición tiene lugar sin la previa inyección de este catión.

II.B.6.B. DEGRADACION

Para poder ir perfilando el papel biológico de las MT, es importante, no sólo conocer acerca de los factores que regulan su biosíntesis, sino también sobre su degradación. Por ejemplo, un rápido recambio podría sugerir que desempeñan un papel funcional dinámico, así como un lento recambio indicaría su implicación en posibles funciones de almacenamiento. También es

importante conocer el destino final de los metales una vez que se liberan tras la degradación de la MT (116).

A partir de los estudios realizados para conocer la vida media de las diferentes MT se puede deducir que el principal mecanismo de degradación de estas macromoléculas es la hidrólisis lisosomal (103,104,116,170), y que otras proteasas son capaces de degradar la parte orgánica libre ya de metales (29,108,109).

La vida media biológica de las metalotioneínas depende del catión que está incorporado a las mismas (171-174). Así mismo esta velocidad de degradación depende de la constante de equilibrio entre la parte proteica y el metal (103,104) y del medio en que se encuentren (condiciones fisiológicas del organismo estudiado). Por ejemplo, la resistencia de las MT a la hidrólisis, principal vía de degradación, es en orden inverso a la secuencia de unión metal-tioneína dada precedentemente (apartado II.B.5.B.); por lo tanto es más fácil la degradación de una MT que contiene zinc, que una que contiene mercurio.

Un caso particular en este tipo de comportamiento lo constituyen las Cu-T (174). Se han podido comprobar grandes diferencias en la vida media de éstas, según que los ensayos se realizasen "in vivo" o "in vitro", por el uso de medios de incubación o muestras no apropiadas. Tanto la vida media como la velocidad de recambio, si se compara con las metalotioneínas de Zn y/o Cd, no está en concordancia con la secuencia de la fuerza de enlace, ya que se degradan rápidamente; aunque la velocidad de "turn over" es muy rápida, ya que se incorpora rápidamente a los lisosomas (170,175,176), estos orgánulos parecen incapaces de degradarla y si lo hacen es en muy pequeña proporción (170,177). Como hipótesis se ha sugerido que la diferencia de comportamiento se debe a la posibilidad de la Cu-T para polimerizarse o bien de que el catión metálico, inicialmente en grado de oxidación (I), pueda oxidarse a Cu(II).

La información existente, así mismo, indica que la vida biológica media varía según la naturaleza de las diferentes isoformas de la MT. Por ejemplo, la vida de la Zn-T I es menor que la de la Zn-T II (171). Análogamente se observó el mismo comportamiento en las Cd-T I y Cd-T II (178) y para las Cu-T I y Cu-T II (122,123). Estas diferencias en la vida biológica media de las dos isoformas se explican por la diferente proporción de los cationes contenidos en las mismas (178). Es interesante indicar que la MT-II, generalmente, tiene una vida media mas larga y, en el caso del cobre, es la que presenta el menor contenido en cobre.

II.B.6.C. ANTIGENICIDAD

Los determinantes antigénicos de las metalotioneínas de vertebrados han sido determinados mediante radioinmunoanálisis por uniones competitivas a dobles anticuerpos. Se ha visto que en la MT existen fundamentalmente dos regiones con capacidad diferente para realizar las uniones; estas regiones corresponden al dominio β , amino-terminal (residuos 1-29) y al dominio α , carboxi-terminal (residuos 30-61). La inmuno-reactividad de la molécula completa se encuentra concentrada en el dominio β de la misma (33,179). Esta antigenicidad es independiente del grado de plegamiento de la metalotioneína. En el dominio β la interacción con el anticuerpo está localizada en la zona de la acetil-metionina terminal y en el agrupamiento de lisinas de la secuencia de 20-25 aminoácidos. Estas secuencias aminoácídicas son análogas en todas las metalotioneínas de vertebrados conocidas, como se ha mostrado precedentemente en la figura 1, lo que implica que no haya especificidad en las reacciones de anticuerpos con las diferentes metalotioneínas.

II.B.6.D. FUNCIONES METABOLICAS RELACIONADAS CON LOS METALES

Que las MT tienen un importante papel en la fisiología está indicado por su presencia universal y la conservación de los residuos de cisteína que unen al metal. Todavía no se ha llegado a esclarecer completamente cada uno de los papeles que pueden presentar las metalotioneínas. No se ha demostrado que posean una actividad enzimática dada. No obstante, se le han atribuido varias funciones; entre éstas cabe destacar: la detoxificación de metales, transporte de metales, homeostasis de ciertos metales, enmascaramiento (secuestración) de radicales libres, participación en reacciones redox y activación de metaloenzimas.

Detoxificación de cationes

En los primeros estudios sobre este aspecto, se atribuyó la biosíntesis de las MT como una respuesta a la exposición a metales pesados y, por lo tanto, un posible mecanismo protector detoxificante.

En trabajos realizados (13,151,180-191) con diferentes adiciones de sales de cadmio se ha comprobado, por una parte, que se producía la síntesis de Cd-T y, por otra, que la incorporación de cadmio en dosis progresivamente más elevadas, provocaba un aumento en la capacidad de captar dicho elemento, lo que implica que se aumente el nivel mínimo de la dosis letal admitida, por un aumento de los niveles de MT presentes en las células, lo que nos lleva a obtener células resistentes al cadmio. Analogamente, aunque las MT no están involucradas en el metabolismo normal del cobre, sí toman parte en procesos de su detoxificación (192). Así mismo, se ha demostrado que no existe una aparente alteración en el metabolismo del cobre en células en las que mediante manipulaciones genéticas se ha extraído el gen capaz de sintetizar las Cu-T. Por el contrario, sí que se comprobó un aumento en el número de genes capaces de sintetizar las MT en células que habían llegado a hacerse resistentes al cobre (193).

El presunto papel de estas moléculas frente a cationes pesados puede ponerse en evidencia en el caso del estudio de los efectos letales del mercurio inorgánico, en la familia de las anguilas (194). El efecto producido por el mercurio presente en el agua marina se controla con la aparición, en las branquias, de las metalotioneínas. Además, las anguilas que han sufrido un tratamiento que les ha llevado a un aumento en la concentración de metalotioneínas son mas resistentes a las dosis letales de mercurio.

La inducción de las diferentes isometalotioneínas, por lo tanto, se puede considerar como un posible marcador biológico del grado de contaminación de un medio determinado (152,195).

El hecho de que no solo los metales pesados, sino otros muchos agentes inducen su biosíntesis, junto con el hecho de encontrarse normalmente en los organismos, hacen pensar que presentan otras funciones, además de la destoxificadora (196).

Transporte metálico

La presencia de proteínas semejantes a las MT en sangre de animales cargados con cadmio se conoce desde hace algún tiempo (66,183,184,197,198). Sin embargo, su caracterización no fue posibles debido a su concentración extremadamente baja. La utilización de radioinmunoanálisis (RIA) para las MT (199,200) permitió detectar la existencia en el plasma sanguíneo de ratas tratadas con cadmio un contenido elevados de Cd-T (200-202). Además, incluso ratas adultas controles presentaban niveles detectables de MT. Debido a su constante de estabilidad y a los valores de vida media se la puede considerar como una proteína transportadora de zinc (200). Estas investigaciones confirman la posibilidad, inicialmente argüida por varios autores (122,200, 202-207), de que las MT pueden estar involucradas en el transporte de metales, especialmente del cadmio, en el organismo.

Homeostasis de cationes

Existen claras evidencias que hacen pensar que las MT pueden tener un papel en la homeostasis de ciertos metales. Así, por ejemplo, cuando se sobrepasa una cierta concentración crítica de zinc en hígado, se induce la biosíntesis de las MT. Se ha observado (122,144,150,197,208,209) que la administración de Zn(II) aumentaba la incorporación tanto del metal como de los aminoácidos marcados en las MT de mucosa intestinal y de células hepáticas, lo que indica que éstas deben tener un papel determinado en el "uptake" de zinc.

Por el contrario, el nivel hepático de cobre no siempre aumenta como resultado de un aumento en la síntesis de MT. Contrariamente al caso del zinc, no se conoce la existencia, en condiciones normales, de metalotioneína asociada sólo a cobre sino que este catión, Cu(I), se asocia a metalotioneínas de zinc, ya que el cobre no es un inductor fuerte de su biosíntesis. Sin embargo, se ha encontrado Cu-t cuando los niveles de cobre libre alcanzan una concentración crítica específica (122,123,208,210).

Parecen existir claras evidencias de que la MT presenta un papel fundamental en la homeostasis del hierro, ya que tanto en la anemia ferropénica como en la inducida por contaminación por cadmio existen elevadas ciertas isoformas de la MT (137,211-217). Estas isoMT se han localizado, tanto en intestino como en el cerebro, lo que le atribuye a este último un papel fundamental en el mecanismo regulador de dicho metal.

Activación de metaloenzimas

Udon y Brady (218) mostraron que la Zn-T "in vitro" podía activar apoformas de enzimas cuya actividad depende de su asociación con Zn, en condiciones no extremas. Por ejemplo, se ha observado que las dos isoformas de la Zn-T presentan diferente capacidad para reactivar la apoanhidrasa carbónica, la isoforma-I genera mayor actividad que la isoforma-II (108).

II.C. ELEMENTOS METALICOS EN SISTEMAS BIOLOGICOS. ANALISIS DE SU CONTENIDO Y ESTUDIO DE SU BIODISPONIBILIDAD

II.C.1. INTRODUCCION

Muchos elementos químicos son indispensables para un adecuado funcionamiento de las funciones fisiológicas y vitales de los seres vivos, de manera que su ausencia o déficit en el organismo (por aumento de las necesidades, escasa absorción o excesiva eliminación) producen alteraciones fisiológicas en el ser vivo e incluso la muerte. Otros, aunque no se conoce bien su papel, se sabe que proporcionan un efecto beneficioso al ser vivo. Sin embargo, existe un tercer grupo que aún en muy pequeñas concentraciones pueden ser extremadamente tóxicos si se introducen por contaminación. Incluso algunos de los esenciales y beneficiosos sobrepasado un cierto nivel de concentración son tóxicos.

El mayor conocimiento de los procesos bioquímicos y especialmente de aquéllos que están relacionados con la presencia de elementos químicos en cantidades muy pequeñas, esenciales para mantener la vida en un equilibrio dinámico, son el objeto de muchas investigaciones. Así mismo es necesario conocer los mecanismos de acción de estos elementos en dichos procesos.

De todo esto, surge la necesidad de desarrollar y aplicar técnicas analíticas que permitan el estudio de trazas de los elementos (metálicos o no) presentes en las muestras de origen biológico y, por tanto, con una matriz compleja. Para este estudio se debe combinar la química analítica con unos conocimientos básicos en biología, fisiología, patología y factores bioquímicos relacionados con las funciones biológicas fundamentales. Se necesita, así mismo, evaluar los cambios que

tienen lugar en la composición de la muestra antes, durante y después del análisis.

Por otra parte, se considera esencial establecer valores de base firmes para las concentraciones elementales en tejidos y fluidos en las denominadas condiciones "normales", con el fin de poder identificar las modificaciones debidas a diferentes alteraciones del sistema vivo. Pero esto es difícil, ya que deben considerarse cierto número de fenómenos concurrentes y correlaciones.

En la figura 6 se muestra las diferentes etapas en un proceso analítico y las posibles fuentes de error en las determinaciones. De ello se deduce que el valor de las conclusiones que se refieren a los sistemas biológicos complejos en equilibrio dinámico depende de la confianza en la bondad del proceso analítico empleado en la obtención de los datos.

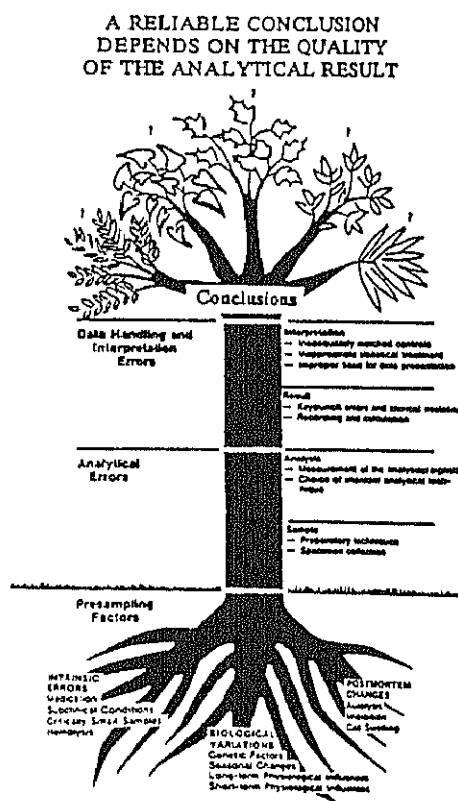


Figura 6. Componentes esenciales del análisis elemental de sistemas biológicos, extraído de (219).

II.C.2. LOS ELEMENTOS QUIMICOS EN SISTEMAS BIOLOGICOS

El desarrollo de los métodos analíticos cuantitativos que proporcionan mayores sensibilidades, menores límites de detección, además de una mayor precisión y exactitud, junto con el uso de materiales estándar de referencia apropiados, una mejor selección y manipulación de la muestra, así como el diseño de nuevos laboratorios de análisis han permitido la determinación de elementos al estado de trazas. Todo ello ha ayudado a comprender mejor el papel de los elementos químicos en los sistemas biológicos y, en algunos casos, a una mayor interpretación de sus efectos tóxicos.

Hasta ahora, se han identificado en tejidos o fluidos biológicos 80 de los 92 elementos que existen de manera natural (220-224). Varios autores han agrupado en tablas periódicas los principales elementos esenciales (225-228).

Los elementos químicos presentes en las diferentes entidades biológicas se pueden clasificar básicamente en 3 grupos:

(a) **Macroelementos no-metálicos o principales:** H, C, N, O y S son los más numerosos y forman parte de estructuras básicas.

(b) **Macroelementos minerales:** Na, K, Mg, Ca, P y Cl, sirven como componentes estructurales de tejidos y además mantienen el equilibrio electrolítico del organismo, en su conjunto.

(c) **Elementos traza:** están presentes en una cantidad inferior al 1% del peso total del organismo.

La tabla 4 es un ejemplo de clasificación de los diferentes elementos hallados en tejidos humanos.

En estos últimos descritos, los elementos traza, centraremos nuestro estudio.

Tabla 4. Principales elementos encontrados en los tejidos humanos

Estructurales: C, Ca, H, N, O, P y S
Electrolitos: Ca, Cl, K, Mg y Na
Trazas: <ul style="list-style-type: none"> - Esenciales: Co, Cr, Cu, Fe, I, Mn, Mo, Se, Zn - Potencialmente esenciales: Cd, Br, B, As, F, Ni, Si, Sn, V, Pb, Li - Tóxicos: Cd, Hg, Pb, As, Be, Cr, Hg, Mn, Ni, Pb, Sb, Si - Potencialmente tóxicos: As, Be, Cd, Hg, Pb, Se, Tl - Otros: Au, Ag, B, Ba, Bi, Br, Ce, Cs, Ga, Ge, Li, Np, Pt, Rb, Sc, Sr, Te, Th, Ti, U, Zr

* Los elementos incluidos en varios grupos lo están en función de la concentración

II.C.2.A. ELEMENTOS TRAZA

Los elementos traza, a pesar de sus bajas concentraciones son de gran importancia para el crecimiento y desarrollo de cualquier entidad viva (229). Como bien expresaron Feinendegen y Kasperek (230) "no existe una relación directa entre la baja concentración de algunos elementos en el organismo vivo y su importancia vital". Se pueden clasificar en 2 grupos principales:

(a) Esenciales: "Un elemento es esencial cuando su ingesta deficiente continuada produce una alteración en alguna función que pasaría de su nivel óptimo a uno sub-óptimo; la suplementación de ese elemento, pero no de otros, restablece la función y, por lo tanto, elimina la alteración" (231).

Actualmente, se han identificado funciones biológicas específicas para 7 elementos traza: Co, Cu, I, Fe, Mo, Se y Zn. Además, se han identificado funciones vitales para el Mn, en animales, pero no en el hombre. Se conocen efectos producidos por la deficiencia de Cr en humanos, pero no se ha podido demostrar de manera concluyente su papel bioquímico. Por otra parte, se ha sugerido la inclusión como nutrientes esenciales de As, B, Br, Cd, F, Pb, Li, Ni, Si, Sn y V (232).

(b) No-esenciales: El resto de los elementos detectados en los organismos vivos se consideran como no-esenciales, y se pueden clasificar en:

- beneficiosos: Ti, Ga, Ge, Rb, Zr, Sb, Ba, Au, Hg y algunos lantánidos (233).
- tóxicos: Ce, Ag, Cd, Pb, Tl y Al (229).
- contaminantes radioactivos: Th, U y transuránicos.

Existen elementos que se incluyen en ambos grupos (234) simultáneamente debido al papel dual que algunos juegan y en función de su concentración. Por lo tanto, es importante definir cuándo un elemento traza es esencial.

Cotzias (235) consideró que un elemento traza es esencial cuando se ajusta a los siguientes condiciones:

- está presente en los tejidos de todo ser vivo sano
- su concentración en diferentes individuos es prácticamente constante
- su deficiencia en el organismo induce, de manera reproducible, las mismas anomalías fisiológicas y estructurales, teniendo en cuenta las especies consideradas.
- la adición de éste al organismo, en la cantidad adecuada, invierte el sentido de estas anomalías o las previene.

- las alteraciones inducidas por la deficiencia del elemento implican cambios bioquímicos significativos.
- estos cambios bioquímicos se pueden evitar o remediar cuando se corrige la deficiencia.

Liebscher y Smith (236) propusieron una representación esquemática de la dependencia de una función biológica en relación con la concentración del elemento traza involucrado en la misma. Observaron que seguía una curva de distribución "normal" (fig. 7).

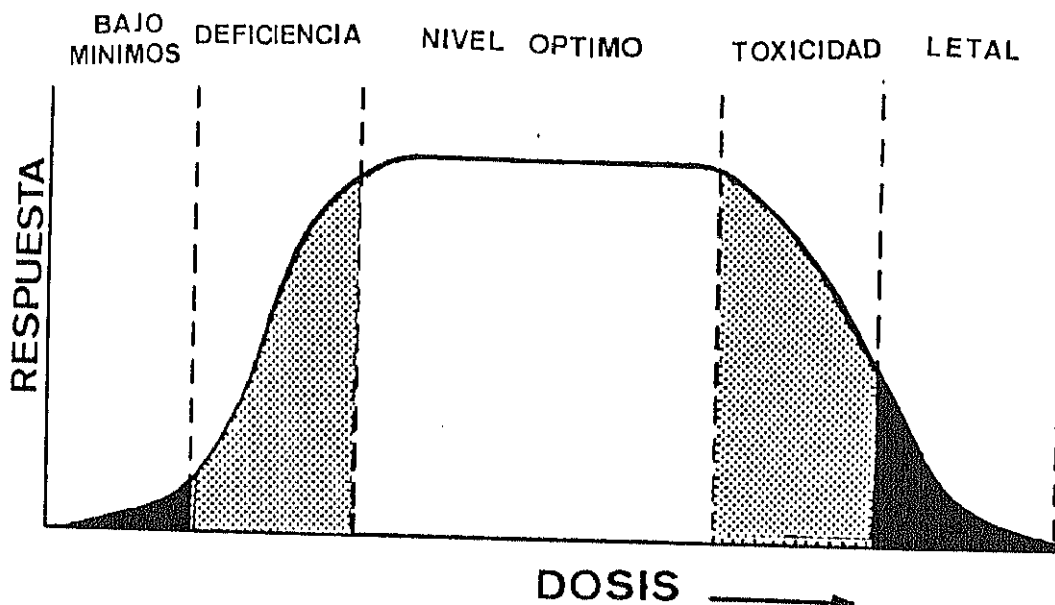


Figura 7. Curva dosis-respuesta para elementos esenciales (236)

Este tipo de curva se ha ido modificando posteriormente (237,238). Por otra parte, refleja la ley de Beltrand (235) en la que se afirma que la función para la que un elemento se considera como esencial es muy baja o nula en una deficiencia teórica de dicho elemento, pero aumenta como consecuencia de un aumento de la exposición a ese elemento. La parte ascendente de la curva, en la figura 8, viene seguida de una meseta en la que se mantiene la función en un intervalo óptimo mediante regulación

homeostática. Cuando se sobrepasa un cierto nivel de concentración, el sistema no posee una suficiente capacidad reguladora y la curva presenta una parte descendente.

En el caso de los elementos traza es evidente que: (i) cada elemento traza posee un intervalo de seguridad y exposición adecuado, concentraciones tisulares permitidas y funciones a niveles óptimos; (ii) cada elemento traza es potencialmente tóxico cuando se sobrepasa el intervalo (i).

Existen otros factores que afectan a los requerimientos de los elementos traza (232):

1. Un error metabólico de nacimiento que afecta a la absorción, retención o excrección.
2. Alteraciones en el metabolismo y/o bioquímica como consecuencia secundaria de una mal-nutrición, enfermedad, lesión o "stress".
3. Deficiencias marginales (ligeras variaciones en la incorporación óptima de un nutriente esencial) inducidas por manipulaciones en la dieta o por interacción directa con otro nutriente orgánico, inorgánico o compuesto químico (sinergismo y antagonismos).
4. Aumento específico de la necesidad de un elemento traza debido a un repentino o severo cambio en los sistemas que necesitan dicho elemento.

Lo anteriormente expuesto se puede resumir, probablemente, diciendo que la incorporación en cantidad insuficiente de un determinado elemento traza llega a manifestarse solamente cuando el organismo está alterado o en una situación de "stress", de manera tal que modifica sus necesidades o interfiere en la utilización de ese elemento.

Recientemente Tapp y Natelson (239) propusieron la siguiente fórmula:

$$\text{Efecto patológico} = \text{Stress} \times \text{Vulnerabilidad orgánica}$$

La relación expresa, en el caso de los elementos, la complejidad de la manifestación de un sistema patológico. Todo sistema biológico presenta un equilibrio dinámico, con relación a los elementos traza, que controla su concentración y se denomina "mecanismo de regulación homeostática". El efecto patológico se manifiesta cuando este mecanismo de regulación sea insuficiente, y esto se produce cuando confluyen dos factores: el "stress" y una vulnerabilidad orgánica específica, que genera una deficiencia en un determinado elemento traza. Como ejemplo se puede citar los estudios del selenio en relación a la vitamina E (240).

II.C.2.B. FUNCION BIOLOGICA DE LOS ELEMENTOS TRAZA

De manera esquemática se presentan los elementos traza que se consideran de gran importancia en los sistemas biológicos y se describen brevemente los compuestos a los que se liga y las funciones potenciales que desempeñan, así como los efectos más destacados que puede producir su deficiencia o su exceso. Se indica, entre paréntesis, la fecha en la que se han descrito por primera vez las funciones de cada elemento (241).

HIERRO (S.XVII). Involucrado en el proceso de transporte electrónico y de oxígeno.

- Ausencia: anemia
- Exceso: peligroso en hemocromatosis

IODO (1850). Constituyente de las hormonas tiroideas.

- Déficit: resulta en bocio y depresión de las funciones tiroideas.
- Exceso: produce tirotoxicosis.

COBRE (1928). Ligado a enzimas oxidativos, interacciona con el hierro. Es esencial para las uniones entre fibras de elastina (tejido conectivo).

- La deficiencia se manifiesta en anemia y cambios en la oxificación.

MANGANESO (1931). Participa en el metabolismo polisacarídico y está relacionada con la "superoxido-dismutasa".

- La deficiencia no produce efectos conocidos en humanos.
- Es tóxico si se inhala y su efecto se manifiesta en desórdenes neurológicos.

ZINC (1934). Forma parte de unas 100 enzimas relacionadas con diferentes procesos metabólicos fundamentales.

- Su deficiencia trae graves consecuencias que se reflejan en una disminución del crecimiento, inmadurez sexual, lesiones en la piel, depresión de la inmunocompetencia,...

COBALTO (1935). Forma parte de la vitamina B₁₂. Su deficiencia en humanos queda establecida por el bajo "intake" (baja incorporación) en dietas vegetarianas y afecta seriamente a algunos sectores de población.

MOLIBDENO (1953). Ligado a la "xantina", "aldehído y sulfido oxidasas".

- Deficiencia: no produce síntomas conocidos en el hombre.
- La excesiva exposición produce un síndrome parecido a la gota.

SELENIO (1957). Componente del enzima "glutation peroxidasa", interacciona con metales pesados.

- Su deficiencia produce una enfermedad conocida como "cardiomiopatía". Esta enfermedad se cura completamente con la administración de selenio.
- Se conocen sus efectos tóxicos en animales.

CROMO (1959). Se cree que activa la insulina.

- Su deficiencia está asociada con una tolerancia a la glucosa alterada y un excesivo nivel de lípidos en suero. Se sospecha que está relacionada con enfermedades cardíacas.
- Se conocen riesgos profesionales, alergias al cromo, eccema y cáncer.

ESTANO (1970). Se cree que es esencial para el crecimiento en los animales. Las interacciones metabólicas no son conocidas.

VANADIO (1971). Se cree que es esencial para el crecimiento en los animales. No se conocen las interacciones metabólicas. Las altas concentraciones interfieren en la absorción del hierro.

FLUOR (1971). Es esencial para la estructura de los dientes, posiblemente de los huesos y puede tener efectos en el crecimiento.

- La deficiencia en humanos se observa mediante una incidencia creciente de la caries; es un posible factor de riesgo para la osteoporosis.
- Tóxico a altas concentraciones. Se ha demostrado la existencia de fluorosis en algunas poblaciones.

SILICIO (1972). Relacionado con la calcificación y posiblemente en la formación del tejido conectivo. No se conocen aspectos sobre su deficiencia.

NIQUEL (1976). Interfiere con la absorción del hierro. Se conocen, en parte, otras interacciones metabólicas.

- El exceso de exposición causa eccema y cáncer.

ARSENICO (1977). Se cree que es esencial para el crecimiento de animales. No se conocen totalmente las interacciones metabólicas.

LITIO. Relacionado con ciertas alteraciones mentales (actúa sobre ciertos neurotransmisores del SNC).

- El exceso produce ataxia, pérdida sensorial, convulsiones e hipotiroidismo.

II.C.2.C. NIVELES DE CONCENTRACION "NORMALES" DE LOS ELEMENTOS TRAZA. RELACION CON SU TOXICIDAD.

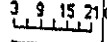
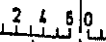
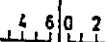
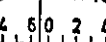
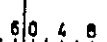
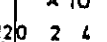


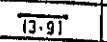


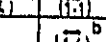
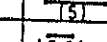
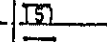
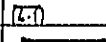

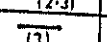
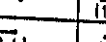

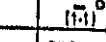
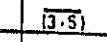
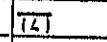
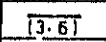

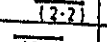
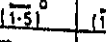
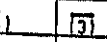
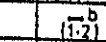
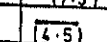
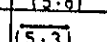
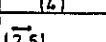

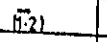
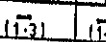
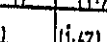
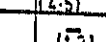
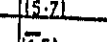
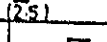


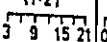
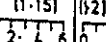
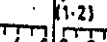
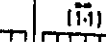
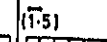
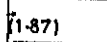




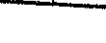
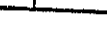
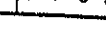
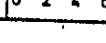
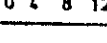









Existen grandes dificultades a la hora de especificar los valores normales de la línea base para cada elemento en diferentes medios biológicos. Existen varios elementos para los que es muy difícil determinar qué cantidad del mismo es intrínseca a la propia sustancia biológica o bien se debe a alguna contaminación producida por alguna de las actividades humanas.

Desde hace varias décadas, se han indicado valores de referencia para diferentes elementos en distintos medios. Sin embargo, estos valores están en continua revisión debido, por una parte, a las mejoras que se han efectuado en las diferentes etapas del proceso analítico en general, particularmente de la toma de muestras y, por otra, a la posibilidad de emplear métodos analíticos cada vez más exactos y precisos, con gran sensibilidad. Como ejemplo de ello se pueden citar los valores de referencia para el cromo en el plasma sanguíneo: 0.14 y 782 ng/ml dados en 1982 y 1956 respectivamente (242). Estas variaciones se deben principalmente a contaminaciones de la muestra y a la falta de controles de calidad, así como a la ausencia de materiales de referencia adecuados. Otras razones menos tangibles, pero no por ello menos importantes, que nos llevan a no confiar plenamente en las primeras determinaciones de elementos traza en materiales biológicos, se deben a una educación y experiencia en química analítica deficientes. Afortunadamente, ahora, esas deficiencias se tienen en cuenta y se lucha contra ellas (243).

Desde los artículos de Versieck y Cornelis (244) y de Versieck (245) en cuanto a las dificultades para establecer los valores de la línea base para varios elementos en suero o plasma, Iyengar (242,246) realizó importantes contribuciones a este problema. Hizo un examen de los resultados obtenidos por 60 investigadores de 40 países para la concentración de 15 elementos traza en tejidos seleccionados de individuos humanos adultos y de fluidos corporales de interés clínico, esta recopilación se puede servir de referencia en toxicología.

Algunos ejemplos de valores "normales" que se aceptan en la actualidad están recopilados (247-249). Un ejemplo se presenta en la tabla 5.

Tabla 5. Concentraciones normales de varios elementos en tejidos y fluidos corporales. La concentración en mg/L de tejido fresco. Tomada de (249).

Element Samples	Ca $\times 10$	Cl $\times 10^3$	K $\times 10^3$	Mg $\times 10^2$	Na $\times 10^3$	Cu	Fe $\times 10^2$	Zn $\times 10$
Brain								
Heart								
Kidney								
Liver								
Lung								
Muscle								
Blood								
Serum								

- a) solo se considera el cerebro b) número de resultados limitado
c) valores únicos.

II.C.2.D. RELACION ENTRE TOXICOLOGIA Y FORMA QUIMICA

También en las dos últimas décadas, gracias a los progresos que se han realizado en química analítica, se ha puesto de manifiesto la importancia que tenía en la calidad del análisis el muestreo, almacenamiento, procesos químicos previos al análisis y a la hora de establecer e interpretar resultados. Por otra parte, también se ha reconocido la importancia que tiene el poder establecer la forma química en la que se encuentra el elemento, objeto de estudio, en un medio dado (250). Un ejemplo claro es la relación entre la forma de un elemento y su toxicidad y/o su esencialidad en un sistema biológico. Así, en las ciencias biológicas, cada vez se presta más atención al significado de las propiedades físicas y fisicoquímicas de los metales, incluyendo: carácter electroquímico, estado de oxidación, compuestos organometálicos, su coordinación y quelación, hidratación, hidrólisis, solubilidad, desarrollo coloidal, tamaño de partícula e interacción con proteínas, ácidos nucleicos y componentes de las membranas (251).

Con respecto a su capacidad para formar complejos, Ahrlund y col. (252) propusieron que los iones metálicos podían clasificarse en 3 categorías: clase A, clase B y intermedios, basándose en sus constantes de equilibrio metal-ligandos. Así mismo Pearson (253) los clasificó como:

- Clase A: los iones metálicos que son ácidos duros
- Clase B: los iones metálicos que son ácidos blandos.

En la clase A se agrupan aquellos elementos metálicos que, de acuerdo con la magnitud de la constante de equilibrio, presentan el siguiente orden de preferencia para los ligandos halogenados: $F^- > Cl^- > Br^- > I^-$ y para ligandos con átomos dadores: $O > N > S = Se$.

La clase B exhibe un orden de preferencia completamente opuesto, tanto para los ligandos halogenados, como para los que tienen átomos dadores.

Los iones intermedios entre ambos grupos constituyen un grupo en el que no existe una clara secuencia de preferencia. En la tabla-6 se representa una lista de iones metálicos de acuerdo a esta clasificación (254).

Tabla 6. Clasificación de los iones metálicos en respecto a su capacidad para formar complejos. (254).

ACIDOS DUROS Clase A	ACIDOS INTERMEDIOS	ACIDOS BLANDOS Clase B
H ⁺ , Li ⁺ , Na ⁺ , K ⁺ , Mn ²⁺ , Cr ³⁺ , Fe ³⁺ , Co ³⁺ , Grupo IIA, Grupo IIIA	Zn ²⁺ , Cu ²⁺ , Ni ²⁺ , Fe ²⁺ , Sn ²⁺ , Pb ²⁺ , As ³⁺ , Sb ³⁺ , Bi ³⁺	Cu ⁺ , Ag ⁺ , Au ⁺ , Tl ⁺ , Pd ²⁺ , Pt ²⁺ , Pt ⁴⁺ , Cd ²⁺ , Hg ²⁺

Esta clasificación de elementos metálicos se basa en consideraciones termodinámicas; sin embargo, en medios complejos, en los que otros aspectos como, por ejemplo, los cinéticos presentan una gran importancia, el orden de preferencia puede ser más relativo y modificarse.

En general, los elementos de la clase A presentan una cierta preferencia por los donadores de oxígeno y los de la clase B por los ligando que tienen nitrógeno y sulfuro donadores en su molécula. Los elementos metálicos denominados intermedios o fronterizos reaccionan con ligandos de todo tipo.

La tabla-7 muestra los grupos funcionales contenidos en una proteína que pueden ligar preferentemente iones de las clases A o B (254).

La toxicidad de un elemento, como ya se ha indicado, depende de la forma química en que se encuentre y, por tanto, de su capacidad para unirse con ligandos o para formar complejos y la forma en que esta unión se efectúe.

Tabla 7. Clasificación de los grupos funcionales por su diferente afinidad.

GRUPOS FUNCIONALES CON AFINIDAD POR LOS IONES METALICOS DE LA CLASE A	GRUPOS FUNCIONALES CON AFINIDAD POR LOS IONES METALICOS DE LA CLASE B
Carboxilato	Sulfidrilo
Carbonílico	Disulfuro
Alcohol	Tioeter
Fosfato	Amino
Fosfodiester	Nitrogeno heterociclico

La incorporación de un elemento metálico en una molécula orgánica, la posibilidad de desplazarse, ser desplazado por otro elemento y, por lo tanto, la modificación o bloqueo de la actividad biológica de dicha molécula depende de la naturaleza del catión y de la constante que rige el equilibrio de incorporación a la misma. Esta modificación de la función está intimamente relacionada con la toxicidad. Ochiai (255) ha dado una clasificación de la capacidad tóxica de los elementos metálicos, basándose en las consideraciones precedentes. Estos elementos pueden actuar:

- bloqueando los grupos funcionales esenciales de las moléculas biológicas
- desplazando al ión metálico esencial de las biomoléculas
- modificando la conformación activa de las biomoléculas y por tanto su propia actividad biológica.

Se puede indicar, así mismo, que los iones de la clase B son más tóxicos que los intermedios y éstos a su vez más que los de la clase A, aunque pueden existir excepciones en función de los organismos estudiados. Por ejemplo, el Be^{2+} (clase B) es extremadamente tóxico, en mamíferos, ya que desplaza al Mg^{2+} de los enzimas Mg^{2+} -dependientes, causando fallos en la replicación del DNA que pueden llevar a procesos cancerosos (254,255). Entre los varios componentes macromoleculares de la célula, los átomos donantes de electrones de los ácidos nucleicos proporcionan múltiples posiciones de unión con los cationes. Si se produce la unión en los sitios fosfato (metales clase A), la neutralización de las cargas negativas puede estabilizar la conformación de la molécula (p. ej. DNA). Sin embargo, con el Cd^{2+} , Cu^{2+} y Pb^{2+} (metales intermedios) la unión se produce con las bases heterocíclicas, lo que puede causar la ruptura de enlaces y desestabilización de la molécula (254). Los iones de la clase B (Hg^{2+} y Cu^{+}) pueden ligar cadenas adyacentes de DNA, produciendo una severa desestabilización.

Existe, por tanto, un alto grado de especiación para los elementos traza en los sistemas biológicos. Por ejemplo, no todas las formas químicas del hierro se incorporan al organismo y, por lo tanto, son efectivas en el tratamiento de las "deficiencias de hierro" ni todas las formas químicas de cobre se utilizan como factor tolerante de la glucosa. La valencia de un elemento también interviene, en gran manera, en su acción biológica; así, el cromo sólo se asimila en su estado Cr(III) , mientras que el Cr(IV) es muy tóxico. De forma análoga, el As(III) es mucho más tóxico que el As(V) y los complejos alquil-Hg son extremadamente tóxicos para los organismos acuáticos.

El cobalto de la Vit. B_{12} es un ejemplo clásico de la bioespecificidad de los elementos traza, ya que esta vitamina es la única forma conocida de cobalto en los seres vivos (227). Por el contrario, la mayoría de los restantes elementos se pueden encontrar en una amplia gama de formas especializadas. Por ejemplo, el hierro forma parte de proteínas transportadoras y de

almacenamiento, también existe como porfirina en la hemoglobina o mioglobina, en citocromos, peroxidasa y catalasas, se puede asociar a sulfuros en las ferredoxinas y, en invertebrados, está presente como pigmento transportador de oxígeno (hemeritrina).

La gran diversidad en la especiación de los elementos químicos traza en los sistemas vivos, es un gran desafío para su estudio bioquímico. La especiación de los elementos metálicos en las muestras biológicas con su compleja matriz orgánica es mucho mas difícil que en las muestras acuosas. Se requieren, por lo tanto, técnicas más sofisticadas y los resultados, a menudo, son mucho más difíciles de interpretar. No obstante, es esencial que se desarrollen los métodos analíticos empleados en la especiación, si se quiere entender con más detalle el papel de los elementos traza, tanto en individuos sanos como alterados.

II.C.3. DETERMINACION DE ELEMENTOS TRAZA EN MATERIALES BIOLOGICOS

II.C.3.A. GENERALIDADES

La calidad del análisis está condicionada por la buena selección de cada una de las etapas de un proceso analítico. Estas etapas se enumeran a continuación:

1.- El paso previo a cualquier análisis es definir los objetivos del análisis e integrar los resultados dentro de un marco global, con la posible intervención de otras disciplinas (química, biología, etc.)

2.- Elección del método y la instrumentación. La elección del método analítico requiere varios factores (256): a) el nivel de confianza requerido en relación a la identidad del analito (número de analitos y concentración esperada), b) los niveles de analito que se necesita o debe determinar, c) el grado de confianza necesario en relación a la precisión y exactitud, d) el grado de validación del método requerido y e) el grado necesario de calidad.

La bondad de una determinación está condicionada por las principales características analíticas de un método: Precisión, exactitud, límite de detección y sensibilidad. La determinación de estas características se realiza, en general, con materiales de referencia, con matriz similar a la de las muestras y en donde la concentración del elemento objeto de estudio está certificada (257-259).

3.- Parámetros premuestreo. Son fundamentales cuando se trabaja con muestras biológicas. Deben considerarse factores genéticos, influencias fisiológicas (219) que pueden hacer a esa muestra diferente.

4.- Muestreo. Hay que tener en cuenta la posibilidad de que esa muestra sea heterogénea, lo que llevaría a errores de muestreo. Por tanto, es diferente si se parte de un "sistema estático o dinámico", si la muestra se toma al azar o si se busca una muestra representativa que pueda servir para extrapolar a una población en general.

5.- Almacenamiento. Hay que estudiar las condiciones de almacenamiento para que la muestra no sufra alteraciones y se mantenga en condiciones óptimas el mayor tiempo posible.

6.- Tratamiento de la muestra. Deben tenerse en cuenta las posibles pérdidas de materiales volátiles, pérdidas durante el almacenamiento (adsorción al contenedor) o pérdidas aparentes por efecto de matriz. La muestra puede tratarse mediante:

- Preconcentración, si los niveles del analito son muy bajos.
- Destrucción de la materia orgánica (matriz) por: a) calcinación precedida de deshidratación (ácidos grasos), b) digestión húmeda (hidratos de carbono), c) microondas (proteínas).

7.- Controlar la contaminación. La contaminación positiva o negativa es un problema inherente al análisis de trazas. La contaminación se da durante y después del muestreo.

8.- Necesidad de realizar un ensayo en blanco.

9.- Se procesan todos los datos obtenidos.

10.- Se exponen e interpretan los resultados teniendo en cuenta los aspectos químicos y bioquímicos y se comparan con los "valores normales".

II.C.3.B. ELECCION DEL METODO ANALITICO

Actualmente existen numerosas técnicas analíticas con la suficiente sensibilidad para poder determinar elementos traza, pero no todas ellas son igual de apropiadas para todos los casos. De aquí que sea necesario seleccionar el método analítico adecuado para cada situación concreta.

El método analítico ideal sería una técnica que fuese aplicable a todos los elementos. Mitchell (260) definió los criterios necesarios para este método ideal:

- 1.- la identificación inequívoca de cada elemento en presencia de los demás,
- 2.- determinación multielemental cuali y cuantitativa,
- 3.- límite de detección al nivel de subnanogramos,
- 4.- no existan efectos de interferencia, de matriz o interelementales,
- 5.- no destructivo,
- 6.- blanco químico o instrumental despreciable,
- 7.- resultados cuantitativos absolutos o calibración real con los estándares de referencia adecuados.

Obviamente, esto es una situación ideal, que no se consigue en la práctica.

Deben considerarse dos aspectos para la elección de un método analítico para el análisis elemental. El primero se refiere al intervalo elemental que es capaz de cubrir un método dado. El segundo relaciona el orden de magnitud de los límites de detección de un método para diferentes elementos con la mayor y menor sensibilidad. Logicamente, los límites de detección no son iguales para todos los elementos, por lo que, en caso de un análisis multielemental, debe llegarse a un compromiso en cuanto a las condiciones experimentales que afectan, al menos, a parte de los elementos existentes en la muestra.

Los factores más importantes a considerar son:

a) Criterios analíticos:

- Precisión y exactitud
- Limite de detección
- Elementos a determinar
- Análisis simple o multielemental
- Determinación de la forma química
- Determinación de la variación espacial

Además hay que tener en cuenta el nivel de concentración del elemento a medir, la cantidad de muestra disponible, la naturaleza de la matriz y efectos interelementales asociados.

b) Criterios prácticos:

- Disponibilidad de la técnica
- Coste
- Duración del análisis
- Forma de la muestra y cantidad

Intervalo elemental: Con excepción de la espectroscopía de masa con fuente de chispa, ninguna técnica analítica es capaz de determinar rutinariamente todos los elementos traza esenciales.

La figura 9 ilustra las posibilidades de diferentes técnicas analíticas importantes con respecto a la determinación de elementos metálicos de interés biológico.

Análisis multielemental: Existen técnicas adecuadas y capaces de realizar un análisis multielemental, útiles para obtener, de forma simultánea, el perfil de la composición elemental de una muestra dada. Esto es importante desde el punto de vista de la interacción fisiológica interelemental. Entre éstas se encuentran:

- Espectroscopía de emisión atómica

- Técnicas de emisión de rayos X
- Espectroscopía de masas con chispa (SSMS)
- Métodos polarográficos
- Técnicas de activación neutrónica (método no destructivo)

Existen otras técnicas que están orientadas hacia el análisis de un elemento. Se puede utilizar la espectrometría de absorción atómica en forma secuencial para analizar varios elementos.

 Indica que la técnica es apropiada

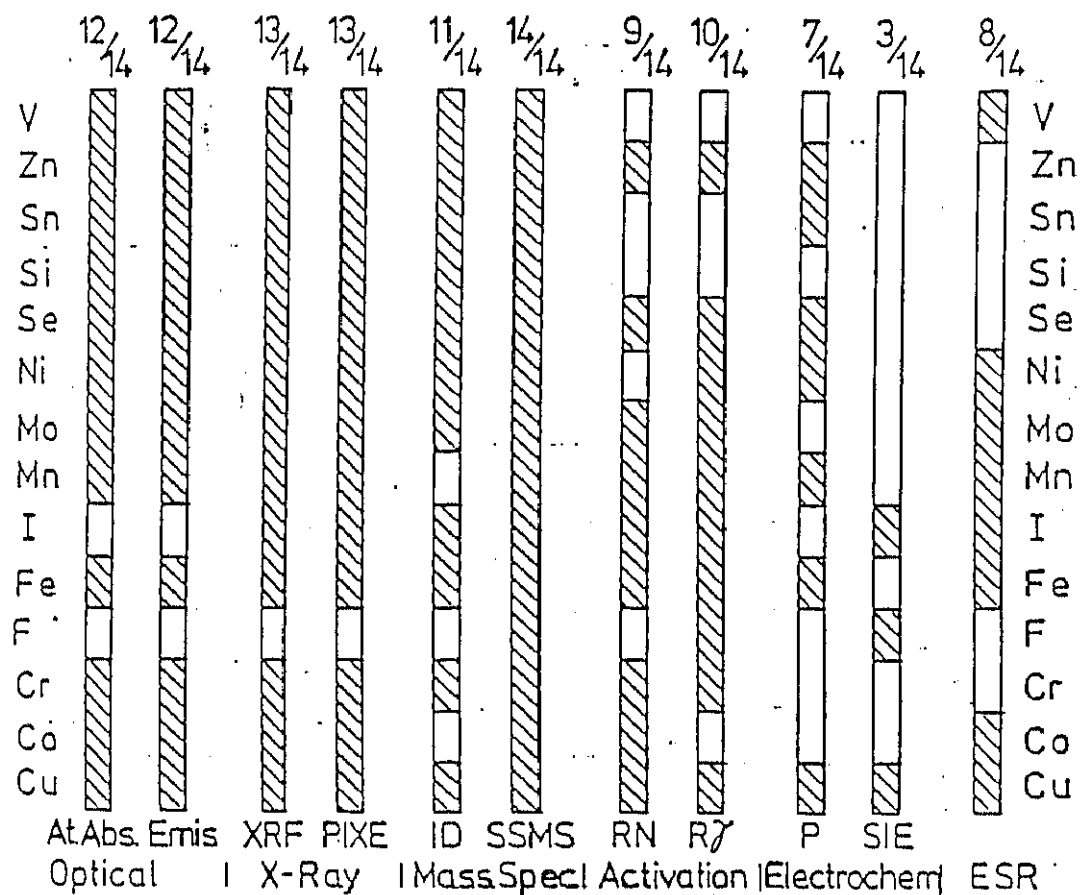


Figura 8. Elemento susceptibles de determinarse por diferentes técnicas analíticas

Determinación de la forma química: Un factor muy a tener en cuenta en el estudio de materiales biológicos es la identificación y/o determinación de la forma química de los elementos. Por esta razón, cada vez se utilizan más las técnicas de espectroscopía: de spín electrónico, magnética nuclear y Raman, en el estudio de los elementos esenciales y su modo de acción biológica.

Entre las técnicas que se aplican al análisis inorgánico, los procesos electroquímicos proporcionan información sobre la forma química.

Variación de la composición elemental: En ciertos casos puede ser necesario establecer cómo varía la concentración de un elemento dado en las distintas partes de la muestra. La técnica microhaz proporciona una información gráfica de gran resolución espacial, pero presenta la limitación de la sensibilidad y los cuidados necesarios para prevenir alteraciones en la composición de la muestra, antes o durante el análisis. También se utilizan ampliamente: PIXE, espectrometría de masas, las técnicas de emisión óptica.

También se utilizan otras técnicas asociadas a las muestras no-tratadas. Debido a la necesidad en el campo bioquímico de los "análisis in vivo". Entre estas se destacan: espectroscopía de fluorescencia de rayos X, potenciometría con electrodos selectivos de iones, espectroscopía de resonancia magnética nuclear y técnicas de activación neutrónica.

II.C.3.C. PRINCIPALES TECNICAS ANALITICAS PARA EL ANALISIS DE ELEMENTOS TRAZA

Las técnicas analíticas más utilizadas para determinar la concentración de los diferentes elementos traza en muestras biológicas se pueden clasificar en cinco grandes grupos (261-264):

- Técnicas ópticas
- Análisis por activación neutrónica
- Espectrometría de masas
- Técnicas electroquímicas
- Otras

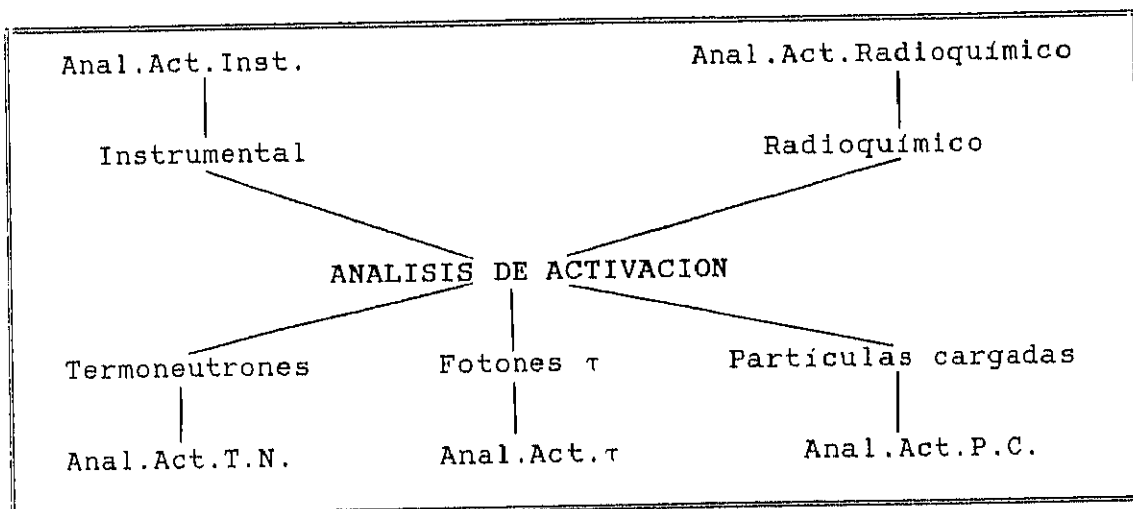
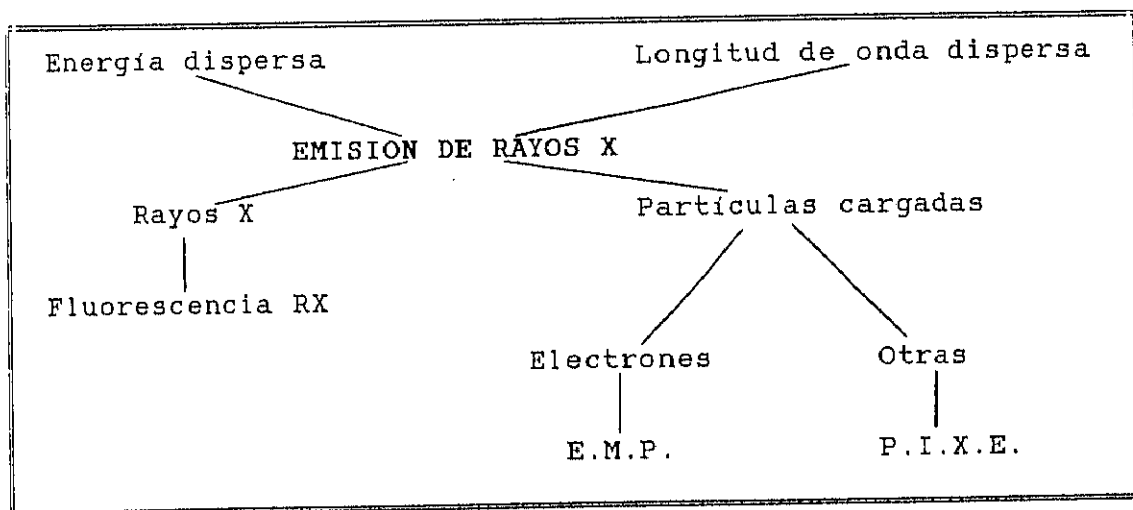
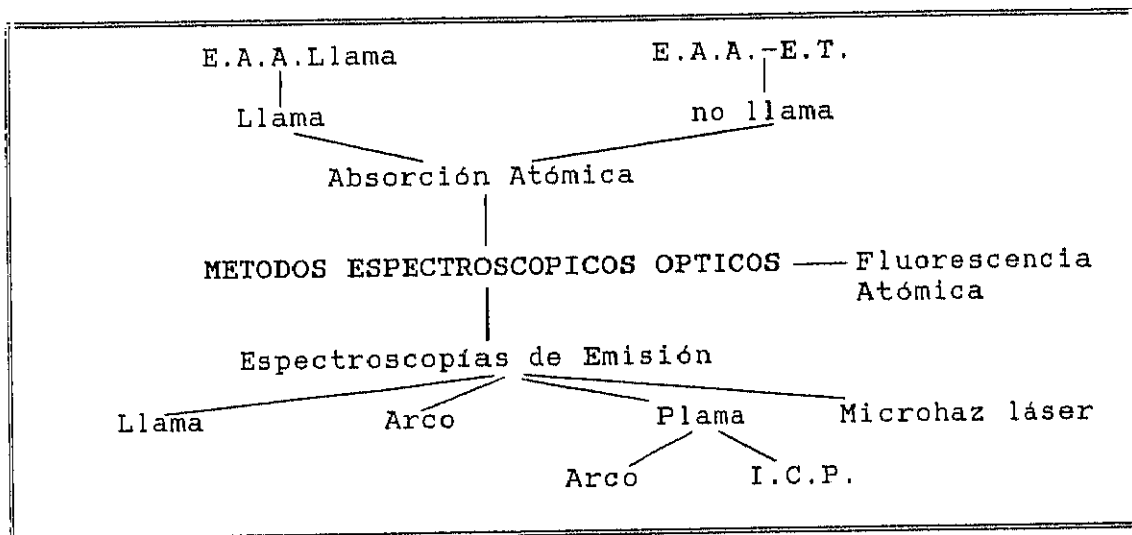
Las técnicas ópticas: Un esquema de estos métodos ópticos se presenta en las figuras 9, 10 y 11.

Existen dos grandes grupos:

- espectrometría de absorción
- espectrometría de emisión

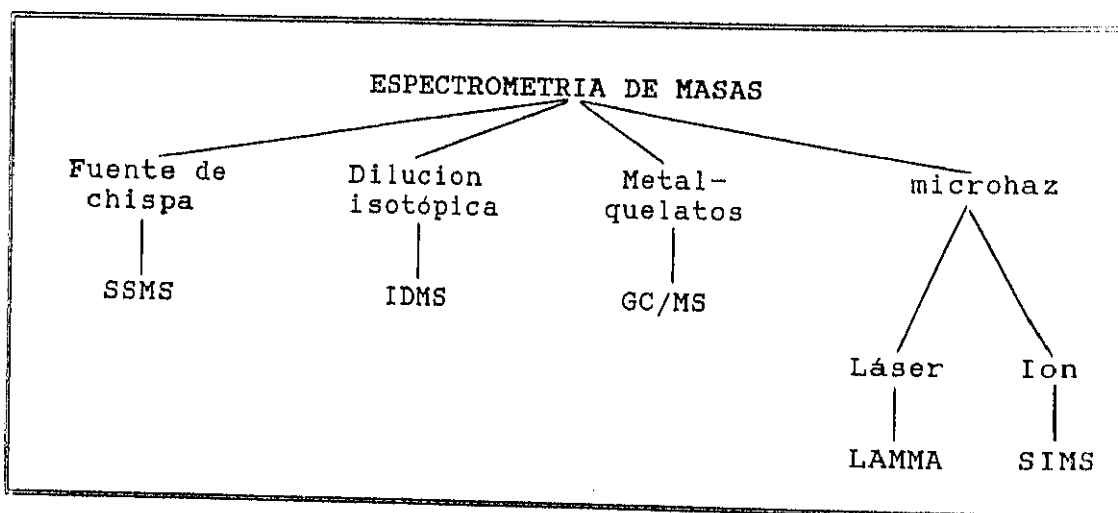
La mayor parte de los métodos de emisión y absorción atómica son métodos de análisis elemental que permiten determinar la concentración total, independientemente de la forma química, de un elemento dado. Por el contrario, la señal obtenida con las técnicas en las que intervienen propiedades moleculares, tanto de absorción, espectrometría, como de emisión, fluorimetría, depende del estado en que se encuentra, en el medio dado, la sustancia que se va a analizar.

Figuras 9, 10, 11. Técnicas ópticas.



Análisis por activación neutrónica: cubre un amplio conjunto de técnicas, pero las de mayor aplicación son las del esquema de la figura d. Como se mide una emisión producida por una especie radioactiva, pueden utilizarse trazadores radioactivos de un elemento determinado para analizar específicamente la evolución de una especie particular. La ausencia de un reactivo blanco es la mayor ventaja de esta técnica.

Espectrometría de masas: es una técnica bien asentada en biología y medicina como método de identificación de la composición y estructura química de especies orgánicas, pero también se utiliza para la determinación de elementos traza. Las técnicas de espectrometría de masas son muy sensibles, precisas, multielementales, pero requieren destruir la matriz y una buena homogeneización de la muestra (figura 12).



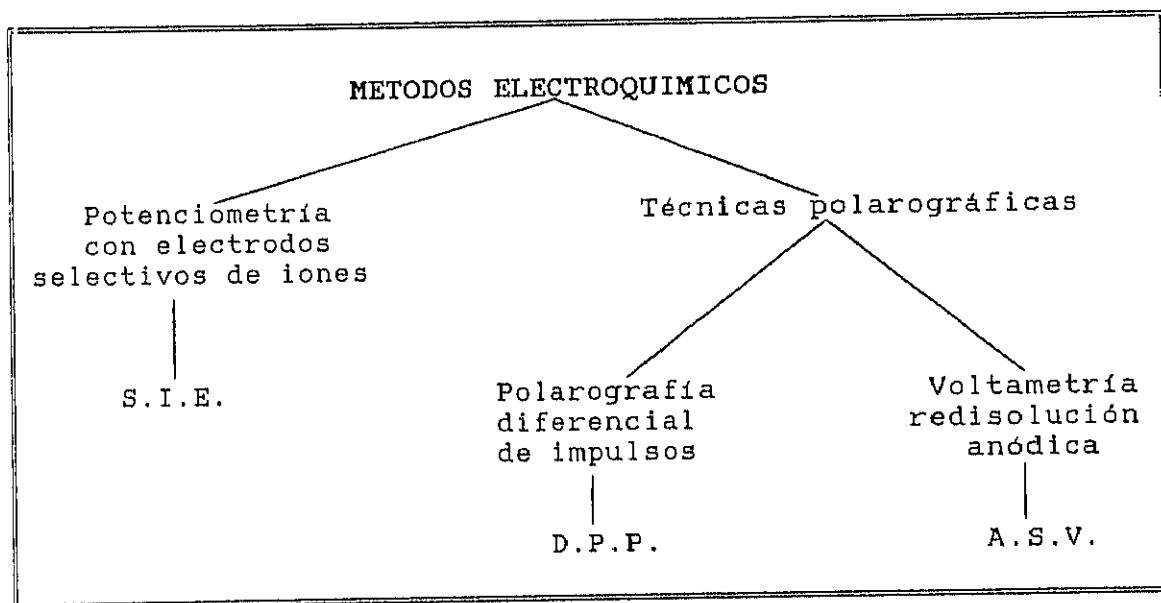
Técnicas electroquímicas: los métodos electroquímicos mas utilizados se dividen en dos grupos, como se presenta en el esquema:

- potenciometría con electrodos selectivos de iones (SIE)
- técnicas polarográficas

Dentro de este apartado cabe destacar la importancia actual de los electrodos modificados de forma molecular que se utilizan como sensores o sondas electroquímicas.

Dentro de las ventajas de estas técnicas electroquímicas, en general, cabe destacar su bajo coste, su posibilidad de especiación y el hecho de ser una técnica multielemental, no destructiva. Entre las desventajas que el analito debe estar en disolución y existen problemas de matriz.

Figura 13. Métodos electroquímicos

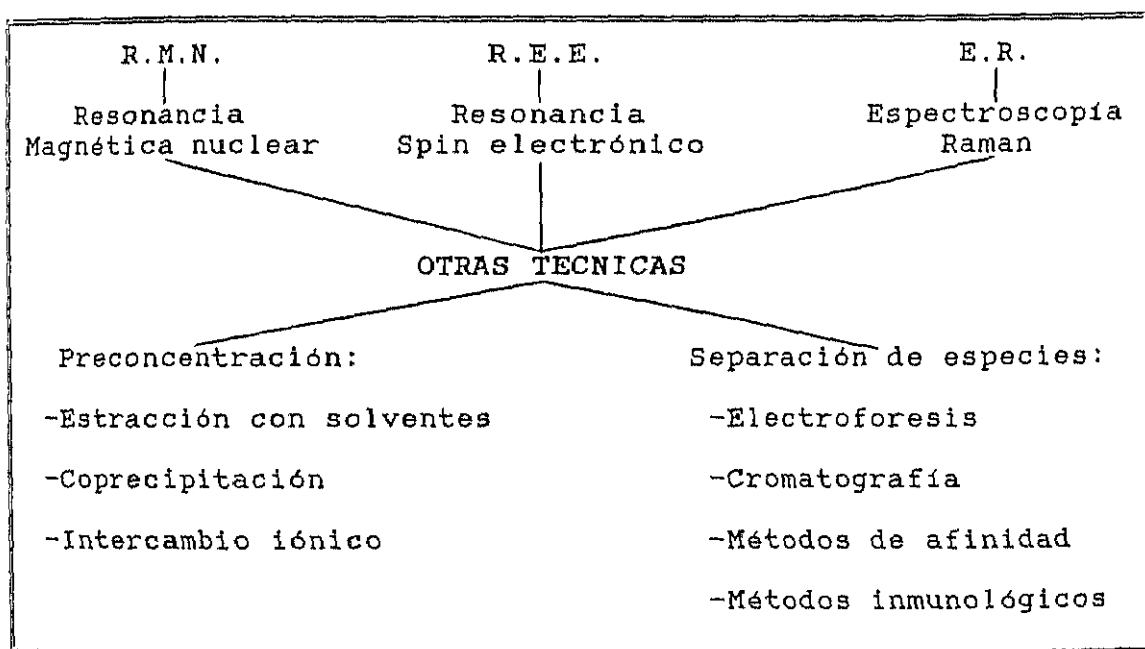


Otras técnicas: En la figura 14 se pueden ver otras técnicas con aplicación en el análisis de elementos traza. Entre ellas se encuentran: NMR, ESR y espectroscopía Raman que se suelen asociar a la determinación de especies orgánicas, pero que cada vez se usan mas para analizar elementos inorgánicos.

- NMR, para el estudio de elementos esenciales "in vivo"
- Espectroscopía Raman para la identificación y medida de especies elementales y el análisis espacial.

Otros métodos de separación, electroforesis, cromatografía, se utilizan combinados con otros métodos ya descritos, consiguiendo establecer las especies biológicas asociadas con el transporte de elementos esenciales específicos. También se utilizan como método de preconcentración del analito, de tal manera que permitan medir los niveles muy bajos de algunos elementos en muestras biológicas.

Figura 14. Otras técnicas analíticas.



II.C.3.D. ESPECIACION QUIMICA

Definición: El término "especie" se refiere a la forma molecular de los átomos de un elemento o "cluster" de átomos de diferentes elementos en una matriz dada (265). El término "componente" puede ser considerado sinónimo de "especie estable". Cada especie tiene su reactividad química y tiempo de vida característicos y reacciona de manera diferente en distintas matrices o medios. La parte de la especie que permanece inalterada durante las transformaciones generadas en la matriz

es la denominada "especie padre". Las especies que existen en un momento dado, en un entorno determinado, son las denominadas "especies de matriz" o "especies funcionales", lo que implica que el término "especie química" sea, de momento, un concepto ideal. Los procesos analíticos generalmente transforman las "especies de matriz" en "especies estables" que pueden ser detectadas y cuantificadas, éstas son las llamadas "especies analitos".

El término especies químicas debe referirse a una configuración molecular precisa de los átomos de un elemento, aunque bastante a menudo las especies analizadas son definidas de manera operacional. Por ejemplo, cuando un elemento está presente en forma particulada o coloidal, no está claro si la partícula pertenece enteramente a una especie o es un grupo de especies que se adsorben o se incluyen dentro de la partícula.

La especiación química se ha utilizado para describir:

- 1.- El análisis de especies para su identificación y cuantificación en una muestra dada. (Análisis de especies).
- 2.- Abundancia o distribución de las especies de un elemento en un medio (distribución o abundancia de especies)
- 3.- La reactividad de una especie dada (reactividad de las especies)
- 4.- La transformación de unas especies en otras.

La cuantificación del elemento total es necesaria para estimar la importancia relativa de las especies presentes, una vez evaluadas éstas. Los métodos empleados en la determinación sólo son válidos si todas las especies presentes se transforman cuantitativamente e irreversiblemente, mediante un tratamiento adecuado de la muestra. Por otra parte, si el análisis necesita una preconcentración previa de la muestra, es probable que las especies originariamente presentes sufran una transformación y, en este caso, el análisis sólo proporcionará información sobre las "especies padres". El método analítico ideal debería

determinar las especies directamente "in situ" e "in vivo", de forma no destructiva.

Métodos analíticos más empleados en especiación:

Para conocer los efectos tóxicos de los metales pesados de otros elementos no sólo se necesita conocer la concentración total, aunque es importante, sino que es incluso más transcendental conocer la forma de unión, la especie química del elemento en esa determinada matriz. Sólo así se pueden sacar conclusiones sobre la movilidad, resorción, biodisponibilidad, acumulación y toxicidad de ese elemento (266).

Los modelos ideados para poder conocer la bioquímica de los elementos se basan en los siguientes conceptos (267):

- a) los metales de transición existen en los fluidos biológicos en un estado cercano al equilibrio entre el ion libre hidratado (concentraciones extremadamente bajas), complejos de bajo peso molecular y proteínas lábiles.
- b) existen metaloproteínas, en las que el metal está fuertemente ligado, la especie es estable y no participa en un intercambio,
- c) los procesos biológicos conllevan una competencia entre los grupos de ligandos y los de iones metálicos.

En la tabla-8 (266) se agrupan algunos de los métodos principales utilizados con éxito para la especiación en análisis. Sin embargo, hay que tener en cuenta que un esquema de especiación es generalmente adecuado para un problema dado y que rara vez se puede aplicar en otro medio diferente.

La determinación de la distribución de los cationes metálicos en el organismo es muy compleja. Además, en la especiación y distribución de los cationes se deben evitar etapas que conlleven una modificación de la matriz por lo que los métodos analíticos utilizados deben ser lo suficientemente sensibles para no requerir una preconcentración de la muestra (268).

Para ilustrar lo expuesto precedentemente, en particular la combinación de técnicas analíticas en la resolución de problemas de especiación, se han elegido una serie de ejemplos de aplicación referentes a diversos cationes metálicos que existen en fluidos biológicos.

Tabla 8. Métodos de análisis de especiación

METODOS PARA EL ANALISIS DE ESPECIACION
A) Métodos de separación: <ul style="list-style-type: none">- extractiva (sólido/sólido, líquido/líquido)- por membranas (diálisis y ultrafiltración)- adsortiva (en un intercambiador iónico o sílice modificada químicamente)- cromatográfica (líquida incluido HPLC, capa fina o de gases)- electroforesis (nativa, en gradiente de poro o isoelectroenfoque)
B) Métodos de detección: <ul style="list-style-type: none">- total, después de digestión (AAS, ICP-AES, fotometría, voltametría/polarografía)- selectiva, según el estado de oxidación/reducción (fotometría, voltametría, potenciometría con electrodos selectivos de iones)- caracterización de ligandos (espectroscopía molecular: IR, UV, fluorescencia; NMR, ESR)
C) Métodos combinados: <ul style="list-style-type: none">- separación en un solo paso (CL/UV, CL/EAA, CL/CFA,RIA)- separación en varios pasos (ultrafiltración/intercambio iónico/AAS, filtración-geles/intercambio-iónico/AAS, filtración-geles/electroforesis/AAS)- especiación en multietapas (se combinan todas las técnicas de separación y detección pertinentes)

En primer lugar, la espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN), técnica empleada para elucidar la estructura de compuestos orgánicos, emplea la medida del momento angular de spin, de cuatro importantes núcleos biológicos, ^1H , ^{13}C , ^{15}N y ^{31}P .

La gran ventaja de la espectroscopía de resonancia magnética nuclear (NMR) para las medidas de especiación biológicas es que este análisis se puede efectuar en organismos vivos. Se puede medir el pH celular con gran precisión con el ^1H NMR.

Las características de enlace de cationes metálicos al glutatión (GSH) se pueden estudiar con NMR. En efecto, esta técnica permite diferenciar si la unión se efectúa solamente a través del grupo tiol, caso del $\text{Hg}(\text{CH}_3)^+$ o si el catión se une simultáneamente a los grupos tiolicos y a la hemoglobina, como en el caso de Zn^{2+} (269). Se han realizado estudios similares en muestras tisulares de biopsias, fluidos biológicos e incluso animales, de manera no destructiva para elucidar el papel de los metales pesados en la salud y enfermedad (270). También se pueden diferenciar los complejos cadmio-tioneína de complejos de cadmio con otras proteínas debido a que estos últimos son más lábiles.

Díálisis y ultrafiltración: Se utiliza en ensayos de especiación de aluminio en sangre, en el caso de individuos que padecen la enfermedad de Alzheimer u osteodistrofia (271-273). También se utiliza para estudiar los sitios específicos de unión del ^{63}Ni a las proteínas (274).

El problema que presentan ambas técnicas, común a la mayoría de las técnicas de separación, es la dificultad de ajustar las condiciones experimentales a las que realmente existen "in vivo". Por tanto, es difícil extrapolar los resultados.

Electroforesis: se ha aplicado la electroforesis al estudio de las características de unión de diferentes metales a proteínas. Se ha utilizado para el estudio de las uniones del plomo a la glicoproteína, α -antiquimiotripsina y a la Ig G (275).

Bradwell y Burnett han descrito una técnica elegante para estudiar las uniones metal-proteína. La técnica, inmuno-electroforesis bidimensional, incluye: electroforesis en gel de agarosa, en una dirección, y en la dirección perpendicular la

inmunoelectroforesis. Este método se ha combinado con la autoradiografía utilizando ^{59}Fe , ^{65}Zn , ^{109}Cd , ^{63}Ni y ^{45}Ca para estudiar las características del enlace entre estos metales y la proteína (276).

Filtración por geles y cromatografía iónica: Una de las técnicas mas versátiles y utilizadas para el estudio de la unión del metal en muestras biológicas es la cromatografía de filtración por geles, técnica que permite separar las moléculas por las características de exclusión de poro del gel.

Se ha aplicado para el estudio de la enfermedad de Wilson (277) y para estudiar la acumulación de cobre (con ^{64}Cu) (278).

Otras técnicas: todos los estudios sobre la distribución de elementos traza se realiza en los componentes solubles del citoplasma. El primer paso, por tanto, es la homogeneización, seguida de centrifugación y posterior separación cromatográfica de las proteínas solubles. Sarx y Baechmann (279) utilizaron una reducción selectiva con Ar/H_2 para evaporar secuencialmente las especies de arsénico de las matrices biológicas, con detección por A.A.S. (espectroscopía de absorción atómica) o espectroscopia de emisión con plasma de microondas (M.I.P.). La especiación del selenio en muestras tisulares se determinó por una técnica similar (280). La técnica nuclear de emisión de RX inducida por bombardeo con un haz de partículas (PIXE) se utilizó para realizar el mapa de la distribución espacial de los elementos traza en diferentes células y partículas subcelulares (277).

II.C.4. DETERMINACION DEL CONTENIDO TOTAL EN RELACION AL CATION ASOCIADO

Entre los compuestos que pueden encontrarse en el líquido citoplasmático, las MT presentan propiedades específicas que permiten su determinación, por el enlace catión tioneína.

Los métodos empleados se pueden diferenciar entre los que proporcionan una información cuantitativa y aquéllos que se pueden considerar como ensayos semicuantitativos o cualitativos, generalmente empleados en estudios bioquímicos. Los primeros se asocian con frecuencia a un método de determinación del catión metálico, bien unido a la tioneína o libre. Entre ellos se pueden considerar las técnicas de separación combinadas con métodos de detección en continuo (espectrofotometría UV-visible) o en discontinuo (espectroscopía de absorción atómica o de emisión) y los que se basan en la saturación del contenido metálico de la metalotioneína y/o en un desplazamiento del catión ligado inicialmente a la metalotioneína por otro que presenta mayor afinidad que el primero. Los segundos se basan en la adición de un anticuerpo creado específicamente y la alteración de la actividad biológica de la metalotioneína.

Fraccionamiento en tamices moleculares, basado en el peso molecular. Debido a su bajo peso molecular las MT se pueden separar fácilmente, con o sin saturación con cadmio, en columnas de sephadex; la detección UV a la longitud de onda (λ) que se atribuye al complejo Cd-T, permite la identificación del pico correspondiente a su peso molecular y su cuantificación por la medida del área de dicho pico (281,282). El problema más importante que cabe destacar es la competencia por fijar el cadmio empleado en la saturación o por otros cationes presentes.

HPLC. La cromatografía líquida de alta eficacia se ha empleado para el fraccionamiento de las diferentes isoformas de MT. La asociación del eluyente a la espectroscopía atómica, de absorción o emisión, permite la cuantificación, en el eluyente,

por análisis del contenido metálico de la MT presente (283,284,285).

Desplazamiento del catión asociado a la tioneína por otro de mayor afinidad.

Mercurio(II). Se han desarrollado métodos de determinación basados en las diferencias de propiedades de los cationes metálicos asociados. El primero propuesto (286) se basa en la gran afinidad del Hg por la metalotioneína y su capacidad de desplazar a este metal previamente ligado, como ya se ha indicado anteriormente (IIA) y en el análisis de este catión añadido en exceso. La selectividad de este método se ha mejorado mediante su asociación a procesos de separación por precipitación o por fraccionamiento en columna de sephadex (286,287,288).

Cadmio(II). La capacidad relativamente elevada de la tioneína para complejar cadmio, en comparación con otras proteínas se puede utilizar para determinar su contenido, tanto en fluidos como en tejidos biológicos (289). La adición de hemoglobina (Hb) permite mejorar la selectividad de este método (290,291,281). En efecto, los resultados de determinación con Cd-hemoglobina de diversas metalotioneínas son comparables con los obtenidos por métodos polarográficos (292,293).

Plata(I). Recientemente se ha propuesto la complejación con Ag(I) (284), catión que presenta gran afinidad por las metalotioneínas. La cantidad de MT presente se deduce conociendo la estequiometría del complejo Ag-T y la concentración de plata en exceso, determinada por A.A.S. o por medio de la medida de la emisión gamma del trazador ¹¹⁰Ag con el método, válido para muestras líquidas, se obtienen resultados por exceso en tejidos (294).

Radioinmunoanálisis (R.I.A.). El radioinmunoanálisis es un método directo y sensible para detectar la presencia de MT,

utilizando anticuerpos específicos. Se emplea generalmente para la determinación en fluidos biológicos como el plasma y la orina (144,295-301) por medio de trazadores radioactivos en la tioneína, ^{109}Cd , o en el anticuerpo inducido, ^{125}I . Recientemente se ha descrito un método (70,302,303) para aplicar esta técnica a la determinación de MT en tejidos. La principal dificultad del empleo del R.I.A. es la generación de anticuerpos específicos.

Otro método de gran sensibilidad y especificidad es el E.L.I.S.A. (Enzimo-inmuno análisis con inmuno-adsorbentes) (288,304,305), que también utiliza el ^{109}Cd para marcar a la MT.

III. DETERMINACION DEL CONTENIDO METALICO EN LAS METALOTIONEINAS

III. DETERMINACION DEL CONTENIDO METALICO EN LAS METALOTIONEINAS

III.A. INTRODUCCION

La mayor parte de los estudios publicados sobre metalotioneínas se han llevado a cabo con productos sintetizados "in vivo" para un trabajo particular, no comercializados. Que nosotros conozcamos, sólo se encuentran comercializadas la metalotioneínas de la casa "Sigma", que son las que hemos utilizado en nuestro trabajo. Estos productos, sintetizados "in vivo", pueden ser de diferente origen, para poder realizar estudios comparativos hemos elegido (Cd,Zn)T de dos orígenes diferentes, caballo y conejo. A su vez dentro de las metalotioneínas procedentes de conejo hemos seleccionado tres que corresponden a la isoforma I, a la II y a una mezcla de ambas.

Al no ser productos con certificación de referencia, la cantidad de catión metálico que incluyen no viene certificada, unicamente se da un valor indicativo de la concentración. Por lo tanto, se necesita conocer de manera precisa la cantidad total de catión ligado a la proteína en cada una de las muestras. Con el fin de determinar la concentración de catión metálico se han elegido dos métodos analíticos independientes, un método óptico, la espectrometría de absorción atómica con horno de grafito (E.T.-A.A.S.) y un método electroquímico, la polarografía diferencial de impulsos (D.P.P.).

Por otra parte, se ha analizado el contenido de diversos cationes metálicos en metalotioneínas procedentes de ratas, sintetizadas "in vivo" en ratas del Departamento de Toxicología (Director Dr. B. Ribas) del Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo (Majadahonda-Madrid).

III.B. PARTE EXPERIMENTAL

III.B.1. PRODUCTOS UTILIZADOS

Para realizar el estudio del contenido metálico hemos utilizado los siguientes productos:

- H₂O bidestilada, generada por un equipo "Autostill Double-D Ionstill"
- soluciones "standards" (TITRISOL, Merck) $1000 \pm 2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (CdCl₂, ZnCl₂, FeCl₃, CrCl₃)
- soluciones intermedias de $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y de $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
- solución de TRIS-ClH $2.5 \cdot 10^{-2} \text{M}$ pH=7.5
TRIS (hidroximetil)aminometano ($3.027 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) de Merck "pro-análisis"
- HNO₃ 0.2% (Merck suprapur) como diluyente en ET-AAS
- (H₄N)H₂PO₄ y MgNO₃ 0.2% (99% pure, Analar BDH) como modificador de matriz en ET-AAS
- LiClO₄ 0.01M como electrolito soporte
- MT comercializadas por SIGMA:
 - MT horse kidney M4766 lot.79F9670
 - MT horse kidney M4766 lot.28F9545
 - MT rabbit liver M7641 lot.20H9650
 - MT-I rabbit liver M5267 lot.129H9575
 - MT-II rabbit liver M5392 lot.79H9510
- MT procedentes del Dpto. de Toxicología del Instituto de Salud Carlos III (Majadahonda-Madrid). En la síntesis de estas metalotioneínas se han utilizado 4 grupos de ratas que fueron sometidas a distintos tratamientos previos. Estos grupos eran:
 - ratas control
 - ratas anémicas
 - ratas anémicas a las que se administró sucesivas dosis de sales de zinc, para inducir un aumento en la síntesis de MT.

- ratas anémicas a las que se administró sucesivas dosis de sales de cadmio

Tanto el método de la inducción de la MT como la obtención y preparación a partir de órganos de rata en donde se acumulan está descrito en (anexo I). El proceso de separación y purificación no permite la obtención de las metalotioneínas puras, sino una mezcla de compuestos diversos, en particular mezcla de proteínas con un peso molecular inferior a los 10000 daltons.

III.B.2. APARATOS

En la determinación del contenido metálico mediante ET-AAS se ha empleado un espectrofotómetro Perkin-Elmer 5000AA equipado con un horno de grafito HGA 400 y un aparato de automuestreo AS-40.

En el análisis por métodos electroquímicos utilizamos un polarógrafo EG&G Par modelo 384B con tres electrodos:

- electrodo de trabajo: electrodo de goteo de mercurio (SMDE)
 - electrodo de referencia: Ag/AgCl en disolución saturada de KCl
 - electrodo auxiliar: filamento de platino
- equipado con una célula electrolítica modelo 303A SMDE

III.B.3. MODO OPERATORIO

El modo operatorio depende de la técnica empleada por lo que este apartado se presenta en dos partes.

III.B.3.A. ESPECTROMETRIA DE ABSORCION ATOMICA CON HORNO DE GRAFITO (ET-AAS)

Se preparan disoluciones patrones de trabajo de sales de Cd(II), Zn(II), Cr(III) y Fe(III), que oscilan entre 0.2 - 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. A cada uno de los patrones se le adiciona HNO_3 0.2% como diluyente. Utilizandose $(\text{H}_4\text{N})\text{H}_2\text{PO}_4$ o MgNO_3 0.2% como modificadores de matriz. Se llevaron a cabo los estudios, por una parte, de optimización de los parámetros instrumentales y, por otro, de las características analíticas del método.

Las condiciones experimentales óptimas se usan para realizar las curvas de calibrado en dos matrices diferente, H_2O y TRIS-ClH $2.5\cdot 10^{-2}\text{M}$ pH=7.5. Este último medio se ha seleccionado ya que es el utilizado para la extracción de las MT a partir de material biológico (306).

Una vez obtenidas las curvas de calibración se utilizaron para determinar el contenido metálicos de las MT comercializadas. Para ello se utiliza el método de interpolación en la recta de calibrado, comprobandose, además, en algún caso con los resultados obtenidos por el método de adiciones patrón.

III.B.3.B. POLAROGRAFIA DIFERENCIAL DE IMPULSOS (DPP)

Se preparan disoluciones patron de CdCl_2 y ZnCl_2 de concentraciones muy bajas ($1-5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) y se realiza un estudio previo de optimización de parámetros y, seguidamente, las características analíticas del método, tanto en disolución acuosa como en $\text{TRIS}\cdot\text{ClH}$ $2.5\cdot 10^{-2}$.

Las condiciones experimentales se emplean en el análisis de las diferentes muestras de metalotioneinas que poseemos.

III.C. RESULTADOS Y DISCUSION

Como en el apartado anterior, éste se va a subdividir en dos, en función de los métodos analíticos empleados.

III.C.1. E.T.-A.A.S.

III.C.1.A. OPTIMIZACION DE PARAMETROS

En la optimización de parámetros se ha tomado como base la indicaciones del manual de Perkin-Elmer (307,308). Se han elegido aquellos parámetros que permiten obtener una señal de absorbancia mayor, es decir la sensibilidad más alta sin pérdida de reproducibilidad. Los parámetros instrumentales relacionados se agrupan en la tabla 9.

Se indican solamente las etapas significativas del análisis que son:

- etapa de secado
- etapa de mineralización
- etapa de atomización

En todos los casos se emplean tubos de pirólisis y como matriz HNO_3 0.2% (v/v).

Tabla 9. Parámetros instrumentales en ET-EAA.

PARAMETROS	Cd	Zn	Cu	Fe
λ (nm)	228.8	213.8	324.8	248.3
rendija (nm)	0.7	0.7	0.7	0.2
T_1 (°C)	130	130	130	130
T_2 (°C)	700	700	1200	1400
T_3 (°C)	1600	1800	2300	2400
tiempo de rampa (s)	15 en 2 10 en 3	15 en 2 10 en 3	15 en 2 10 en 3	15 en 2 10 en 3
tiempo de mantenimto	25 en 2 25 en 3	25 en 2 25 en 3	25 en 2 25 en 3	25 en 2 25 en 3
Modificador de matriz	H_4N H_2 PO_4 0.2 mg	H_4N H_2 PO_4 0.2 mg	ninguno	HNO_3 0.05 mg

Siendo:

- T_1 : temperatura de secado
- T_2 : temperatura de mineralización
- T_3 : temperatura de atomización

III.C.1.B. CARACTERISTICAS ANALITICAS DEL METODO

En la tabla 10 se muestran las características analíticas del método obtenidas para el cadmio, zinc, cobre y hierro.

Se ha tomado como concentración característica aquella que corresponde, en la recta de calibrado, a una señal de 0.044 unidades de absorbancia, el límite de detección se estima como la señal correspondiente a tres veces la desviación del blanco obtenida a partir de 5 medidas; la precisión expresada como coeficiente de variación se ha calculado a partir de la recta de calibrado que presentaba 10 puntos. Así mismo se ha estudiado la influencia de un elemento en presencia de otro. Tanto para el zinc, como para el cadmio, se ha comprobado que no existen interferencias para una concentración 100 veces mayor del elemento interferente con respecto a la del analito. Estas características se agrupan en la tabla 10.

Por otra parte, se ha realizado un estudio sobre la influencia de diferentes matrices (H_2O , HNO_3 y $TRIS-ClH$ $2.5 \cdot 10^{-1}M$ $pH=7.5$) en la linealidad de la respuesta y la sensibilidad de la pendiente. Se ha seleccionado como medio mas apropiado una solución de HNO_3 0.2% ya que es el que presenta mayor sensibilidad y intervalo de linealidad.

Tabla 10. Características analíticas para la ET-EAA

PARAMETROS	Cadmio	Zinc	Cobre	Hierro
Concent. caracter.	0.35	0.72	0.73	1.7
Intervalo linealidad	0.2-6.0	0.4-8.0	0.5-10.0	1.0-20.0
Límite de detección	0.05	0.30	0.19	1.22
Precisión C.V. (%)	1.34%	4.43%	5.64%	2.49%

Las concentraciones se expresan en $\mu\text{g-L}^{-1}$

III.C.2. METODOS ELECTROQUIMICOS: METODOS VOLTAMETRICOS

III.C.2.A. OPTIMIZACION DE PARAMETROS

Con el objeto de seleccionar un método electroquímico adecuado para realizar el análisis del contenido metálico en las metalotioneínas se ha realizado un estudio previo usando un electrolito soporte clásico en polarografía, LiClO_4 10^{-2}M en agua y disoluciones patrón acuosas de los cationes cadmio y zinc. Las técnicas empleadas han sido la polarografía diferencial de impulsos (D.P.P.) y la voltametría de redisolución anódica (D.P.S.). En la primera, los parámetros que se han variado, han sido el tiempo de purga, el tiempo de goteo del electrodo, la amplitud de impulso y la velocidad de barrido. En el segundo, además de los ya citados, se ha estudiado la influencia del potencial de deposición, tiempo de deposición y el tiempo de equilibrio. Así mismo, en los dos casos, se ha determinado el dominio de electroactividad del disolvente.

Tabla 11. Parámetros instrumentales en polarografía

TECNICA	PARAMETROS	Cadmio	Zinc
D.P.P.	E_p (V)	-0.670	-1.076
D.P.P.	D.E.A. (V)	+0.3 a -1.5	+0.3 a -1.5
D.P.P.	v (mV/s)	2	2
D.P.S.	ΔE (mV)	50	50
	t_{purga} (s)	300	300
D.P.S.	E_p (V)	-0.714	-1.140
	E_{dep} (V)	-1.300	-1.300
	t_{dep} (s)	180	180
	t_{eq} (s)	90	90

Medio LiClO_4 0.01M en H_2O

De todo ello se deduce que la D.P.P. es una técnica adecuada y más rápida que la D.P.S. para la realización de los análisis a las concentraciones de cationes metálicos que deben estar presentes en las muestras consideradas. Los parámetros seleccionados para D.P.P. se agrupan en la siguiente tabla 11.

Se observa que los cationes se reducen a potenciales lo suficientemente diferenciales como para permitir la determinación simultánea de ambos.

Cuando se utiliza como medio el TRIS-HCl $2.5 \cdot 10^{-4} \text{M}$ pH=7.5 varían algunos parámetros como el dominio de electroactividad del disolvente (D.E.A.) que se ve reducido (tabla 12).

Tabla 12. Parámetros que varían al utilizar TRIS HCl como disolvente.

TECNICA	PARAMETROS	Cadmio	Zinc
DPP y DPS	D.E.A. (V)	+0.1 a -1.3	+0.1 a -1.3
D.P.P.	E_p (V)	-0.552	-0.972
D.P.S.	E_p (V)	-0.620	-1.103

III.C.2.B. CARACTERISTICAS DEL METODO

Una vez seleccionados los parámetros, se realizan curvas de calibrado en función de la concentración para cada uno de los cationes en el medio utilizado. En la tabla se presentan las características analíticas: intervalo de linealidad, límite de detección expresado como la concentración correspondiente a tres veces la desviación estándar del blanco obtenida a partir de 10

medidas y la precisión expresada como el coeficiente de variación de la recta de calibrado. Se indica la ecuación de la recta de calibrado correspondiente a cada elemento y se ha comprobado, además, que no existen interferencias de cada uno de los cationes en la determinación del otro (13).

Tabla 13. Características analíticas en DPP

PARAMETROS	Cadmio	Zinc
Linealidad	0.6 - 10.0	0.6 - 6.0
Precisión	< 1%	< 1%
Límite detección	0.63	0.15
Ecuación de la recta	$r = 0.999$ $2.279 + 4.877 X$	$r = 0.998$ $0.025 + 3.645 X$

Todas las concentraciones se expresan en $\mu\text{g/L}$

III.C.3. DETERMINACION DEL CONTENIDO DE CATIONES METALICOS

III.C.3.A. MUESTRAS COMERCIALIZADAS POR S.I.G.M.A.

Las muestras comercializadas se han analizado por los dos métodos indicados precedentemente. En el caso de la polarografía la determinación se ha llevado a cabo a $\text{pH}=2.0$, valor al cual los cationes se encuentran en la disolución como cationes libres, no asociados a la proteína. Como se expondrá con detalle en el capítulo V de esta memoria. Con el fin de minimizar interferencias de matriz, en este medio orgánico de composición desconocida, se ha utilizado el método de adiciones patrón para todas las muestras.

El análisis del contenido metálico de las MT comerciales se presenta en la tabla 14 y se compara con el valor indicado en la etiqueta.

Los valores obtenidos mediante dos métodos independientes, ET-AAS y DPP realizada a $\text{pH}=2.0$ están en perfecta concordancia. Esto nos lleva a concluir que a $\text{pH}=2.0$ la proteína presenta sus grupos tiólicos protonados, se encuentra como apotioneína libre de cationes metálicos, quedando éstos en disolución como cationes libres.

Tabla 14. Determinación de las concentraciones de zinc y cadmio en las metalotioneinas de SIGMA

CONC. mg/g	cadmio			zinc		
COMPUESTO	ET-AAS	DPP	SIGMA	ET-AAS	DPP	SIGMA
MT horse kidney M4766 lot.79F9670	45.10 ±1.46	44.64 ±1.71	49	16.78 ±0.43	18.28 ±0.43	16
MT horse kidney M4766 lot.28F9545	^A 35.96 35.2±0.7	36.79 ±0.22	34	^A 8.8 8.9±0.23	7.25 ±0.41	9
MT rabbit liver M7641 lot.20H9650	83.22 ±1.50	87.39 ±0.97	67.4	13.25 ±0.38	13.17 ±0.15	11.2
MT-I rabbit liver M5267 lot.129F9575	^A 64.32 65.1±1.4	68.60 ±1.40	73	11.07 ±0.30	10.59 ±0.56	11.0
MT-II rabbit liver M5392 lot.79F9510	72.05 ±1.42	68.67 ±0.35	69.3	10.02 ±0.28	9.84 ±0.45	9.1

Las determinaciones se han realizado por adiciones patrón excepto:

*obtenidas por adiciones patrón y por comparación con la recta de calibrado

III.C.3.B. MUESTRAS SINTETIZADAS EN EL DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGIA. INSTITUTO DE SALUD CARLOS III.

Se ha aplicado el método de ET-AAS a las muestras obtenidas a partir de los cuatro grupos de ratas, control, anemia-control, anemia-Zn y anemia-Cd, para calcular el contenido de hierro, cadmio, zinc y cobre presente. Se obtuvieron los resultados indicados en la tabla 15 por el método de las adiciones patrón, ya que no conocíamos de manera precisa la composición del medio en que se encontraban disueltas lo que hacía difícil obtener una recta de calibrado lo suficientemente fiable.

Debe indicarse, por otra parte, que el estudio mediante DPP a pH=2.0 no proporcionó datos suficientemente fiables, por lo que no se indican.

Tabla 15. Valores de concentración metálica de las muestras
sintetizadas en el Dpto. Toxi. Inst. Salud Carlos III

MUESTRA	Cadmio ($\mu\text{g/L}$)	Zinc ($\mu\text{g/L}$)	Cobre ($\mu\text{g/L}$)	Hierro ($\mu\text{g/L}$)
Control:				
F-30	—	2565 \pm 40	5.4 \pm 0.3	111.7 \pm 6.0
F-32	—	3040 \pm 12	—	—
F-33	—	1288 \pm 25	—	—
F-34	—	1372 \pm 21	—	—
Anemia:				
F-30	—	136 \pm 10	23.0 \pm 3.4	—
F-32	—	343 \pm 26	22.7 \pm 4.8	—
F-33	—	306 \pm 18	—	—
F-34	—	644 \pm 12	—	—
Anemia-Cd:				
F-30	1278 \pm 322	—	—	—
F-32	1385 \pm 329	—	—	—
F-33	1234 \pm 266	—	—	—
F-34	1132 \pm 210	—	26.1 \pm 3.5	—
Anemia-Zn:				
F-30	—	1360 \pm 42	9.9 \pm 0.8	—
F-32	—	1497 \pm 312	7.1 \pm 0.3	—
F-33	—	—	57.9 \pm 3.7	—
F-34	—	152 \pm 7.5	34.4 \pm 0.8	—

(—) indica valores por debajo del límite de detección

IV. ESTUDIO ESPECTROFOTOMETRICO UV
DE LAS METALOTIONEINAS Y
COMPUESTOS INTRINSECOS A SU
ESTRUCTURA:L-CISTEINA Y
FRAGMENTO TERMINAL 56-61 DE MT-I

IV. ESTUDIO ESPECTROFOTOMETRICO UV DE MT Y COMPUESTOS INTRINSECOS A SU ESTRUCTURA: L-CISTEINA Y EL FRAGMENTO 56-61 DE MT-I

IV.A. INTRODUCCION

Las características espectrofotométricas UV de las MT reflejan tanto la composición aminoacídica correspondiente a una macromolécula compleja constituida por un polipéptido, como la composición debida a los enlaces catión metálico-proteína.

Se pueden destacar las siguientes características: no presentan absorbancia a 280 nm, ya que carecen de aminoácidos aromáticos, existe además, una banda de absorción a 190 nm en la región donde absorben las amidas y a la que contribuyen, de manera aditiva, las transiciones de los 61 enlaces amida primarios, las dos correspondientes a dos amidas secundarias y a los 20 residuos de cisteína (84,99,112). Otra característica de absorción presente en toda la banda del tipo de transferencia de carga y que es típica de los complejos metal-tiolato (138,139,140); la longitud de onda a la que aparece esta banda depende de la naturaleza del catión metálico ligado (12,19,24,45, 72,80,83,84,95,102,112,117,132,134).

En la tabla se agrupan las longitudes de onda a las que presenta absorción el complejo metal-proteína y que se encuentran en la literatura científica.

Además cuando ocurre un desplazamiento de un metal por otro en la MT se produce consecuentemente un desplazamiento del hombro de absorción, debido a la diferencia de las características del catión ligado al grupo tiol y no a fenómenos de modificaciones conformacionales en la molécula (103).

Tabla 16. Longitudes de onda y coeficientes de absorción molar de los distintos grupos metal tiolato estudiados.

METAL	λ (nm)	ξ (L/mol·cm)
apoT	190	7400
Cd(II)	250	16000
Zn(II)	230	17000
Cu(I)	270	3650
Ag(I)	255	----
Hg(II)	270, 308 ¹	----
Co(II)	320	19960
Pb(II)	400	----

(*) dependiendo que el número de cationes coordinados sea mayor o menor a cuatro. (---) No dados en la literatura

Al disminuir el pH se liberan los cationes de su unión a la proteína y estas bandas de absorción desaparecen (11,12,14,16,19, 45,72,84,87,124,134,207). Por otra parte, el coeficiente de absorción molar depende de la cantidad de catión metálico enlazado a la tioneína (24).

El empleo de los métodos espectrofotométricos para el estudio de las MT es muy amplio y se encuentran numerosos artículos científicos en la bibliografía. Estos se pueden diferenciar en dos grandes grupos, según el objetivo con el cual se aplique esta técnica, aquellos en los que este método se utilizan para la caracterización y la determinación de metales en las MT y aquellos en los que se emplea como método de detección o control durante un proceso. En este último caso existe la asociación de dos o más técnicas diferentes. En la tabla 17 se agrupan los resultados más significativos obtenidos con métodos espectrofotométricos aplicados a la caracterización o al control de las MT. En ella se indica el tipo de muestra utilizada, el catión asociado a la proteína y diferentes parámetros instrumentales que pueden resultar de utilidad, así como la combinación de técnicas que se ha empleado.

Tabla 17 A. METODOS DE CARACTERIZACION

ORIGEN MT ESTUDIADA	CATION ASOCIADO	INTERVALO λ λ CARACT.	TIPO ESTUDIO	MEDIO	OBSERVACIONES	Ref
Hígado de ratas y pollos (Cd,Zn)T apoT	Cd(II) Zn(II)	200-360	$A=f(c)$ $\xi_{250}(MT)=8.06 \cdot 10^4$ $\xi_{250}(apoT)_{pH\ 8.6}=1.32 \cdot 10^4$ $\xi_{250}(apoT)_{pH\ 6.6}=1.87 \cdot 10^4$	TRIS·HCl 10mM pH=6.6 pH=1.4 EDTA pH 8.6	Uniones Cd, Zn a los grupos tiólicos de las cisteínas.	72
Corteza renal equina (Cd,Zn)T apoT	Cd(II) Zn(II)	200-300 $\lambda_c=250nm$	$A=f(c)$ $\xi_{250}=1.45 \cdot 10^4$	pH=5.5 EDTA pH=4.5	En presencia de EDTA y pH 4.5 desaparece la absorción a 250nm Resultados comparables con D.C.	16

ORIGEN MT ESTUDIADA	CATION ASOCIADO	INTERVALO λ λ CARACT.	TIPO ESTUDIO	MEDIO	OBSERVACIONES	Ref
Invertebrados: hepatopancreas de cangrejo, camarones "Cryptochiton stellery" (Cd,Zn)T	Cd(II) Zn(II)	220-310 $\lambda_c=250\text{nm}$	Perfil espectro- fotométrico depende de la isoforma.	TRIS·HCl 10mM pH=8.6	Caracterización de las 2 isoformas procedentes de tres especies	124
Corteza renal humanos (Cd,Zn,Cu)T	Cd(II) Zn(II) Cu(I) Hg(II)	210-300 $\lambda_c=250\text{nm}$	$A=f(c)$ $\epsilon_{250}(\text{pH } 7.0) = 1.04 \cdot 10^4$ $\epsilon_{250}(\text{pH } 8.6) = 1.72 \cdot 10^4$	TRIS·HCl 10^{-3}M pH=7.0 pH=2.0	Valoración del contenido metálico por la absorción a 250nm. Influencia de otros metales. Resultados compa- rables a los de D.C.	14

ORIGEN MT ESTUDIADA	CATION ASOCIADO	INTERVALO λ λ CARACT.	TIPO ESTUDIO	MEDIO	OBSERVACIONES	Ref
Hígado humano (Cd,Zn)T apoT	Cd(II) Zn(II)	180-270 $\lambda_c=190\text{nm}$ $\lambda_c=220\text{nm}$	$A=f(c)$ $\xi_{250}(\text{pH } 7.0) = 1.59 \cdot 10^5$ $\xi_{250}(\text{pH } 8.6) = 5.44 \cdot 10^5$ $\xi_{250}(\text{pH } 7.0) = 4.73 \cdot 10^4$ $\xi_{250}(\text{pH } 8.6) = 4.58 \cdot 10^5$	Tampón fosfato 0.05M pH7 HClO ₄ 0.02M pH1.7	Caracterización de las principales Zn-T	66
Hígado de rata MT-I MT-II	Cd(II) Zn(II) Cu(I) Hg(II)	215-310	Influencia del catión asociado en el espectro U.V.	Tampón fosfato 0.01M pH=7.8	Diferente afinidad de MT por los distintos cationes. Posibilidad de desplazamiento de un catión por otro depende del catión asociado a MT	136

ORIGEN MT ESTUDIADA	CATION ASOCIADO	INTERVALO λ λ CARACT.	TIPO ESTUDIO	MEDIO	OBSERVACIONES	Ref
Hígado conejo (Cd, Zn)T	Cd(II) Zn(II)	220-310 $\lambda_c=250\text{nm}$	Caracterización de las dos isoformas.	NaCl 0.9% pH=7.8	Perfiles de isoMT depende del contenido metálico pI diferente para cada isoforma.	19
Hígado de rata (Cd, Zn)T (Cd, Cu)T	Cd(II) Zn(II) Cu(I)	210-310 estudio en función pH 200-340 adiciones de cationes	Influencia pH y de la adición de cationes (Cd^{+2})	pH 7.5-1.5	Modificaciones de la estructura de los "clusters" por exceso de catión metálico asociado.	207

ORIGEN MT ESTUDIADA	CATION ASOCIADO	INTERVALO λ λ CARACT.	TIPO ESTUDIO	MEDIO	OBSERVACIONES	Ref
Corteza renal de caballos (Cd,Zn)T apoT	Cd(II) Zn(II)	200-300 $\lambda_c=250\text{nm}$ $\lambda_c=215\text{nm}$	$A=f(c)$ $\xi_{250}=1.59 \cdot 10^5$ Influencia pH Adiciones de Cd(II). Estequeometría del complejo.	Tampón fosfato/ succinato $5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ pH 5.0	Medida a $\lambda=250\text{nm}$ como método de control de aislamiento Estequeometría $[M(II) (Cys_3)]^-$	12
Hígado pollo (Cd,Zn)T	Cd(II) Zn(II) Cu(I)	200-380	Efecto de la adición de cobre sobre (Cd,Zn)T	Tampón fosfato $8.3 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ pH 7.0	Resultados comparables con D.C. Aplicación para el estudio de la enfermedad de Wilson	85

ORIGEN MT ESTUDIADA	CATION ASOCIADO	INTERVALO λ λ CARACT.	TIPO ESTUDIO	MEDIO	OBSERVACIONES	Ref
Levaduras "Sacharomices cerevisiae" Cu-T, apoT Pollo (Cd,Zn)T, apoT	Cd(II) Zn(II) Cu(I)	210-375 $\lambda_c=270\text{nm}$	Identificación de Cu-T en levadura. Comparación con Cu-T de pollo.	Tampón fosfato $5 \cdot 10^{-3}\text{M}$ pH 7.5 Tampón fosfato $8.3 \cdot 10^{-3}\text{M}$ pH 7.0	Caracterización de Cu-T, compuesto de gran significado biológico. Cu-T fácilmente oxidable.	132 58
Pollo (Cd,Zn)T	Cd(II) Zn(II) Cu(I)	240-400	Modificación del espectro al desplazar Cd^{2+} y Zn^{2+} por Cu^+	Tampón fosfato $8.3 \cdot 10^{-3}\text{M}$ pH 7.0	Estequeometría de las Cu-T: $[\text{Cu(I) Cys}_4]^-$ Relación con la enfermedad de Wilson	87

ORIGEN MT ESTUDIADA	CATION ASOCIADO	INTERVALO λ λ CARACT.	TIPO ESTUDIO	MEDIO	OBSERVACIONES	Ref
Hígado y riñón de caballo (Cd,Zn)T apoT	Cd(II) Zn(II) Hg(II)	190-400	$A=f(c)$ $\xi_{190}(MT)=5.0 \cdot 10^5$ $\xi_{190}(apoT)=4.5 \cdot 10^5$	Fosfato 0.001 M pH 7.5 NaCl 0.1M Fosfato 0.03 M pH 7.5	Banda de absorción del catión. Banda Cd-S y Zn-S superpuestas por lo que no posibilidad de identificación separadamente. Comparación (Cd,Zn)T con (Cd,Zn)mercapto- etanol	86
Hígado de conejo (Cd,Zn)T-I	Cd(II) Zn(II) CoII)	280-510 500-900	Desplazamiento de los metales asociados a MT por Co(II) $A=f(c_{Co})$	TRIS base 0.5 M pH 7.0	Estudio de la estructura de los "cluster" Respuesta depende del número de átomos de cobalto asociados	112

ORIGEN MT ESTUDIADA	CATION ASOCIADO	INTERVALO λ λ CARACT.	TIPO ESTUDIO	MEDIO	OBSERVACIONES	Ref
Hígado rata apoT-I apoT-II	Cd(II) Zn(II)	210-320	Tipos de asociación MT en los "clusters" es diferente. Uniones Me-T: - dominio α 4 Cd ²⁺ - dominio β 1Cd ²⁺ , 2Zn ²⁺ Relación A ₂₅₀ y el número de átomos asociados	TRIS-HCl 10 mM pH 8.6	Comparación entre (Cd,Zn)T nativas y las reconstituidas a partir de Cd ²⁺ , Zn ²⁺ y apoT. Orden de reconstitución de las uniones: primero dominio β , despues dominio α	29

ORIGEN MT ESTUDIADA	CATION ASOCIADO	INTERVALO λ λ CARACT.	TIPO ESTUDIO	MEDIO	OBSERVACIONES	Ref
Hígado humano MT-I MT-II apoT	Cd(II) Zn(II)	180-270 $\lambda_c=190\text{nm}$ $\lambda_c=250\text{nm}$	Variación en función del pH $A=f(c)$ $\xi_{190}(\text{pH } 7)=5.44 \cdot 10^5$ $\xi_{190}(\text{pH } 1.7)=1.4 \cdot 10^5$ $\xi_{220}(\text{pH } 7)=4.73 \cdot 10^5$ $\xi_{250}(\text{pH } 1.7)=4.7 \cdot 10^4$	Fosfato 0.05 M pH 7 HClO ₄ 0.02M pH 1.7	A_{190} debida a las transiciones amida, cisteína y metionina A_{250} a las transiciones σ^*_{S-X} A pH ácido A_{250} desaparece y A_{190} disminuye.	99
Hígado pollo (Cd,Zn)T apoT	Cd(II) Zn(II) Cu(I)	200-400 $\lambda_c=275\text{nm}$ $\lambda_c=250\text{nm}$	Modelización de estructuras	Fosfato $8.3 \cdot 10^{-3}\text{M}$ pH 7	Concordancia de resultados con U.V. y D.C. Comparación con un modelo simple D- Penicilamina	135

ORIGEN MT ESTUDIADA	CATION ASOCIADO	INTERVALO λ λ CARACT.	TIPO ESTUDIO	MEDIO	OBSERVACIONES	Ref
"Neurospora crassa" "Sacharomyces" Cd-T	Cd(II) Hg(II)	210-350	Estructura de MT Cinética de intercambio de cationes asociados	Fosfato K 0.5 M pH 7.5	Coordinación en los "clusters" - tetraédrica: - Cd-T - Hg-T (Hg>4) - lineal: - Hg-T (Hg<4)	68
Hígado de ratas albinas (Cd,Zn,Cu)T	Cd(II) Zn(II) Cu(I)	253-280 235-300	Influencia del pH y del medio en el perfil espectro- fotométrico.	TRIS-HCl $2.5 \cdot 10^{-2}$ M pH 8.6	Asociación con el método de D.C. Resultados complementarios.	134

ORIGEN MT ESTUDIADA	CATION ASOCIADO	INTERVALO λ λ CARACT.	TIPO ESTUDIO	MEDIO	OBSERVACIONES	Ref
Riñón humano (Cd,Zn)T apoT	Cd(II) Zn(II) Hg(II) Pb(II)	180-600	Estructura de las MT según el metal asociado.	TRIS·HCl 10 mM pH 8.6 pH 2.0	Combinación con RMN y D.C. Existencia de los 2 "clusters" independientes entre sí. Estequeometría: [Me(II)(Cys) ₃] ⁻	80

$$\xi = \text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

D.C. dicroísmo circular

En el segundo apartado de la tabla (tabla 17B) "Control y detección", el método espectrofotométrico se emplea como detector en la elución de los componentes de un método de separación en general, filtración de geles. En este caso, no se indica en la tabla. Solamente se menciona la asociación con otra técnica analítica, en el apartado "obsevaciones", cuando ésta no es la técnica de separación indicada precedentemente.

Tabla 17B. M E T O D O S D E C O N T R O L Y D E T E C C I O N

ORIGEN MT ESTUDIADA	CATION ASOCIADO	λ CARACTE- RISTICA	METODOS COMPLE- MENTAR.	TIPO ESTUDIO	MEDIO	OBSERVACIONES	Ref
Hígado rata inyectada con CdCl ₂	Cd(II) Hg(II)	250nm	Fluori- metría	Estructural, en relación al complejo formado	fosfato 10 ⁻² M pH 7.8	Afinidad de los dominios α y β por el cadmio y zinc respectivamente.	110
Hígado rata apo T	Bi(III), Cd(II), Co(II), Hg(II), Zn(II), Ni(I), Pb(II), Sb(III) Os(II), Pd(II), Pt(IV), Re(V), Rh(III), Tl(III) Ag(I), Cu(I)	250nm	Fluori- metría	Afinidad de los distintos cationes por la MT: -desplazamiento -proteolisis -valoración volumétrica	HEPES acetato 0.05 M pH variab.	Orden de afinidad de los cationes: Hg>Cu>Ag>Pb>Cd>Ni> Zn>Co	31

ORIGEN MT ESTUDIADA	CATION ASOCIADO	λ CARACTE- RISTICA	METODOS COMPLE- MENTAR.	TIPO ESTUDIO	MEDIO	OBSERVACIONES	Ref
Hígado rata	Zn(II)	280nm	Trazado- res radioac- tivos ³⁵ S, ⁶⁵ Zn	Vida media de las Zn-T en el organismo.	TRIS/ acetato 50/200 pH 7.4 (gradiente)	Presentan una vida media corta, 20h, se degrada la parte orgánica y el metal se elimina.	309
Riñón caballo (Zn,Cd)T	Cd(II) Zn(II) Al(III) Ba(II) Ca(II) Mg(II)	280nm 250nm	Espect. Absorc. Atomica E.A.A.	Contenido metálico Fuerza de unión Cd-T y Zn-T Identificación	Fosfato sódico 0.05M pH 7	Empleo de E.A.A. para valorar metales Fuerza de union: Zn-T<Cd-T por desplazamiento	11

ORIGEN MT ESTUDIADA	CATION ASOCIADO	λ CARACTE- RISTICA	METODOS COMPLE- MENTAR.	TIPO ESTUDIO	MEDIO	OBSERVACIONES	Ref
Hígado humano (Cd,Zn)T	Cd(II) Zn(II) Cu(I)	280nm	-----	Identificación de las diferentes isoformas.	TRIS 0.02 M pH 8.6	El contenido metálico depende de la isoforma.	69
Hígado y riñón de ratas inducidas con Zn(II)	Cu(I) Zn(II)	254nm 280nm	E.A.A.	Cinética de degradación de las Cu-T	TRIS 10^{-3} M pH 8.6	La velocidad de degradación depende del metal asociado: CdT<CuT<ZnT	26
Hígado conejo (Cd,Zn)T	Cd(II) Zn(II)	250nm 280nm	-----	Determinación de la estructura de los clusters.	TRIS 0.1M pH 7.4	El "cluster A" presenta: - 11 cys - 4 M ²⁺ El "cluster B" - 9 cys - 3 M ²⁺	25

ORIGEN MT ESTUDIADA	CATION ASOCIADO	λ CARACTE- RISTICA	METODOS COMPLE- MENTAR.	TIPO ESTUDIO	MEDIO	OBSERVACIONES	Ref
Hígado y riñón caballo (Cd, Zn)T	Cd(II) Zn(II)	250nm 280nm	----	Caracterización y contenido metálico.	TRIS 0.02 M pH 8.6	En función del origen las MT presentan diferente contenido metálico.	20
SIGMA: riñón caballo -54F8590 -46F9695 -74F8620 hígado conejo -105F9625 Hígado rata Hígado de feto de bóvidos.	Cd(II) Zn(II) Cu(I)	220nm	E.A.A. H.P.L.C de alta resoluc	Valoración del contenido metálico y comparación con el valor indicado en la etiqueta.	TRIS $5 \cdot 10^{-1}M$ pH 7.0	Los valores obtenidos por ambas técnicas: ET-AAS y HPLC y los de la etiqueta no coinciden.	298

ORIGEN MT ESTUDIADA	CATION ASOCIADO	λ CARACTE- RISTICA	METODOS COMPLE- MENTAR.	TIPO ESTUDIO	MEDIO	OBSERVACIONES	Ref
Hígado ratas albinas (Cd,Zn,Cu)T	Cd(II) Zn(II) Cu(I)	253nm 280nm	D.C. R.X.	Influencia del contenido metálico Influencia pH Influencia del medio	TRIS 0.025M pH 8.6	Diferente conformación estructural en los "clusters" según el metal asociado.	134
Hígado humano Hígado caballo	Zn(II)	220nm	-----	Caracterización Cálculo de pK'y K _{estab.}	-----	pK _a = 8.9 K _{est.} = 10 ¹¹ M ⁻¹ Complejos fuertes.	102
Hígado y riñón caballo (Cd,Zn)T	Cd(II) Zn(II)	250nm 280nm	-----	Optimización de los procesos de extracción.	TRIS 0.02 M pH 8.6	Adición de mercaptoetanol para evitar la polimerización.	27

ORIGEN MT ESTUDIADA	CATION ASOCIADO	λ CARACTE- RISTICA	METODOS COMPLE- MENTAR.	TIPO ESTUDIO	MEDIO	OBSERVACIONES	Ref
Hígado conejo (Cd,Zn)T	Cd(II) Zn(II)	250nm 280nm	----	Caracterización Contenido en aminoácidos Contenido metálico	TRIS 0.02 M pH 8.6	La exposición a Cd(II) provoca la inducción de la MT-B en hígado.	77
Hígado ratas inyectadas con cobre (Cu,Zn)T	Cu(I) Zn(II)	250nm	----	Determinación de aminoácidos de metales Relación: Cys/Metal	TRIS	La relación cys/metal<3, ya que existe cobre en la MT y su estequiometría es menor. cys/metal=2.6/1.6	119

ORIGEN MT ESTUDIADA	CATION ASOCIADO	λ CARACTE- RISTICA	METODOS COMPLE- MENTAR.	TIPO ESTUDIO	MEDIO	OBSERVACIONES	Ref
Hígado rata MT-I MT-II	Cd(II) Zn(II)	214nm 254nm 280nm	H.P.L.C E.A.A.	Desarrollo de un nuevo método para la cuantificación de MT	TRIS 0.02 M pH 7.4 TRIS 0.2 M pH 7.4	Detección U.V. del eluyente H.P.L.C. Método rápido, reproducible y sensible.	24
Hígado caballo MT-1B (Cd, Zn)T	Cd(II) Zn(II)	280nm	----	Determinación de la secuencia de aminoácidos Coordinación metal-cisteína.	----	Las cisteínas se encuentran en posiciones fijas. Coordinación: $\text{Me}^{2+}(\text{Cys}^-)_3$	21

ORIGEN MT ESTUDIADA	CATION ASOCIADO	λ CARACTE- RISTICA	METODOS COMPLE- MENTAR.	TIPO ESTUDIO	MEDIO	OBSERVACIONES	Ref
<i>Mytilus edulis</i> Mejillones MT-I MT-II	Cd(II)	254nm 280nm	-----	Determinación de la composición aminoacídica.	TRIS 0.1-0.4 pH 8.5	Las diferentes isoformas varían ligeramente en la composición aminoacídica.	55
Corteza renal caballos	Cd(II)	280nm	-----	Identificación Caracterización	pH 7 pH 12	Las proteínas de cadmio presentes en hígado son MT	10
Hígado pollo Hígado fetal bóvidos Rata <i>Sacharomyces</i> <i>cerevisiae</i>	Cu(I)	300nm 250nm 280nm	D.C.	Identificación Caracterización Coordinación: 2cys/1Cu Est. oxid=1	-----	Es una proteína estable al pH Facilmente oxidable.	95

ORIGEN MT ESTUDIADA	CATION ASOCIADO	λ CARACTE- RISTICA	METODOS COMPLE- MENTAR.	TIPO ESTUDIO	MEDIO	OBSERVACIONES	Ref
Hígado ratón Cd-T	Cd(II)	250nm 280nm	trazad. rad.act ¹⁰⁹ Cd	Valoración contenido en cadmio	TRIS 0.01M pH 8	Método de seguimiento del cadmio en el organismo	117
Hígado ratón (Cu,Zn)T	Cd(II) Zn(II)	250nm 280nm	----	Contenido metálico Composición aminoacídica	TRIS 0.01 M pH 8.6	Con la cromatografía de exclusión se pueden preparar las isoformas	74
Hígado de rumiantes (Zn,Cu)T	Zn(II) Cu(I)	280nm	----	Composición de aminoácidos Contenido metálico	TRIS/ acetato 0.01M pH 8.2	Valoración de la distribución de cationes en las diferentes fracciones proteicas.	209

ORIGEN MT ESTUDIADA	CATION ASOCIADO	λCARACTE- RISTICA	METODOS COMPLE- MENTAR.	TIPO ESTUDIO	MEDIO	OBSERVACIONES	Ref
<i>Neurospora crassa</i> Cu-T	Cu(I)	250nm 280nm	----	Identificación Caracterización	TRIS 0.02M pH 8	Los organismos inferiores también sintetizan MT	61
Hígado cerdo (Cu, Zn)T	Cu(I) Zn(II)	280nm	----	Identificación Secuenciación de aminoácidos en las tres isoformas.	TRIS/ acetato 10-500 mM pH 7.4	La secuencia de aminoácidos es análoga a las procedentes de ratas.	118
Hígado fetos de bóvidos	Cu(I) Zn(II)	250nm 280nm 300nm	----	Optimización de los procesos de extracción.	TRIS 0.02 M pH 8.6	Condiciones anaeróbicas para evitar la polimerización.	45
Oligopéptidos sintéticos con tres residuos de cisteína.	Cd(II)	250nm	Método de la ditizona	Capacidad complejante de los péptidos.	TRIS 0.01 M pH 7.0	Para determinar el papel de estas MT en el organismo.	179

Existen, por supuesto, numerosos estudios en los que se emplea la espectrofotometría para la caracterización, análisis o determinación de los diversos compuestos que contienen grupos tióles, tales como la cisteína y compuestos derivados, entre otros. Resulta evidente que no se pueden citar todos los que han sido consultados, por lo que nos limitaremos a mencionar los relacionados con estudios fundamentales, que hemos estimado más interesantes, desde un punto de vista químico-físico (138,139, 140). En ellos se indican la dependencia de propiedades espectrofotométricas de diferentes compuestos con grupos tiólicos como mercaptanos, alquil sulfuros y polipéptidos, con relación a diversos parámetros como puede ser el pH.

Como se pone de manifiesto en la información reagrupada en la tabla 17, la espectrofotometría de absorción molecular en el U.V. presenta múltiples aplicaciones en el estudio y la caracterización de MT. Esta técnica se puede usar como método de detección a la salida de una columna cromatográfica en procesos de separación de diferente naturaleza o en las diferentes fracciones procedentes del isoelectroenfoque, método que permite la separación de las diferentes isoformas. En general, se emplea la combinación de diferentes señales de absorbancia a longitudes de onda características (detección a 250 y 220 nm y la no detección a 280nm) (24,34,41,50,57,68,75,81,83,130,298). Otros autores utilizan esta técnica para confirmar la separación de las dos isoformas (19,84,124,136) ya que los perfiles de absorción son algo diferentes debido a la diferencia en la composición metálica y la ligera variación aminoacídica.

En otros trabajos se utiliza para observar los efectos producidos por el desplazamiento de los metales de su unión a la proteína, bien por adición de otros cationes metálicos, cobre, cadmio, zinc, mercurio y plata (12,13,29,31,45,58,87,136), adición de agentes complejantes como el EDTA (110) o por una brusca disminución del pH hasta valores ácidos (11,14,16,45,72, 134,141). En último caso, se ha comprobado que a bajos pH el

metal se encuentra totalmente desplazado, por los protones del medio, pero que si se aumenta el pH en presencia de cationes metálicos, se vuelve a obtener la proteína con los cationes ligados, puesto que reaparece la señal de absorbancia en el intervalo de longitudes de onda correspondientes a los enlaces metal-tiol.

Por otra parte, la espectrofotometría UV es un método clásico, ampliamente utilizado, para la determinación de constantes de equilibrio, bien ácido-base o bien de complejación. Así, las constantes de disociación ácido-base de la MT se han evaluado, (12) y de otros compuestos que contienen cisteína en su molécula. Además, las constantes de asociación, K_{MT} , presentan un valor comprendido entre 10^{11} - 10^{19} según el metal asociado (21,70,83,144).

Así mismo, debido a la diferencia de la señal de absorción a longitudes de onda particulares que corresponden, bien a grupos funcionales característicos de naturaleza orgánica o bien a los enlaces metal-ligando, se puede emplear como método de determinación de la forma química de los cationes metálicos y conocer si éstos están como iones libres o asociados a la proteína.

La MT es una molécula complicada, cuyo peso molecular exacto es desconocido y varía en función del origen. Para poder abordar el estudio de manera mas simple se ha llevado a cabo una comparación de los resultados de la MT obtenidos con otros ensayos realizados con moléculas mas sencillas que se encuentran incluidas en la estructura proteica de la metalotioneína, en particular con la cisteína y con el fragmento 56-61 de la MT-I que ha sido sintetizado y contiene tres residuos de cisteína.

Existen numerosos estudios realizados sobre la cisteína, pero solamente hemos citado tres referentes a estudios físico-químicos sobre las características espectrofotométricas de su enlace con cationes metálicos. Por esta razón sólo hemos

realizado ensayos puntuales que nos servirán para comparar. Sin embargo, del fragmento apenas existen estudios y éstos no son sistemáticos (179), únicamente se ha estudiado su capacidad para unirse a cadmio y/o zinc, de aquí el interés de nuestro trabajo.

El objetivo de éste estudio es establecer analogías entre las diferentes MT, el fragmento y la cisteína y, así, determinar qué grupos funcionales intervienen en la respuesta. Así mismo, el estudio del comportamiento de la cisteína y del fragmento en función de las adiciones de cadmio y/o zinc para poder establecer semejanzas y analogías con las (Cd,Zn)-T.

Además, a partir de los estudios realizados de absorbancia en función de la concentración para los tres tipos de compuestos, se trata de buscar una relación de la señal con el número de equivalentes de cisteína y así encontrar un método para su determinación.

IV.B. PARTE EXPERIMENTAL

IV.B.1. APARATOS

En el análisis espectrofotométrico UV-VIS de las diferentes disoluciones de cisteína, fragmento o metalotioneína de diferente origen se han empleado los siguientes instrumentos:

- Espectrofotómetro UV-visible de la casa Perkin-Elmer modelo Lambda 7.
- El pH de las diferentes disoluciones se midió con un pHmetro MINISIS 5000 de Tacussel y como agitador un HEILDOPH MR2002.
- El equipo para destilar agua es un "Autostill Double D-Ionostill".
- Una caja de guantes con atmósfera de N_2 nos permitió trabajar en ausencia de oxígeno.
- Para realizar las adiciones patrón se emplearon micropipetas "Eppendorf" de 10-100 μ L, 20 μ L y 50 μ L.

IV.B.2. REACTIVOS

Los reactivos utilizados en los diferentes estudios espectrofotométricos realizados son:

- Las muestras comercializadas por SIGMA de MT, ya descritas en el capítulo tercero de esta memoria.
- El fragmento 56-61 L4512 lot. 39F5810 (80% de riqueza) de origen sintético y comercializado por SIGMA en forma de acetato, que incluye como agente reductor, antioxidante, el mercaptoetanol.
- La L-cisteína C7755 lot. 114F0672 comercializada por SIGMA.
- TRIS (hidroximetil) aminometano, Merck "pro-análisi".
- Agua bidestilada.
- Disolución de HCl 0.1M para ajustar el pH.
- Disolución de NaOH 0.1M para ajustar el pH.
- Na_2HPO_4 Merck "pro-análisi".

- NaH_2PO_4 Merck "pro-análisis".
- Disoluciones estándar de TITRISOL, Merck $1000\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1} \pm 2\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de CdCl_2 , ZnCl_2 y $\text{H}_2(\text{PtCl}_6)\cdot 6\text{H}_2\text{O}$.
- CdCl_2 U.C.B. "pro-análisi".
- Mezcla crómica

IV.B.3. PREPARACION DE DISOLUCIONES

En los estudios realizados mediante la espectrofotometría de absorción molecular UV-visible se han empleado las siguientes disoluciones:

Para calibrar el espectrofotómetro en la región del UV, región en la que hemos realizado los ensayos, se preparó una disolución de naftaleno $1,36\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en ciclohexano (ref.a).

Los medios empleados para preparar las disoluciones fueron los siguientes:

- Tampón fosfato Na $4\cdot 10^{-1}$ y 0.1M a pH 7.4
- $\text{TRIS}\cdot\text{HCl}$ 2.5 y $5.0\cdot 10^{-2}\text{M}$ a pH 7.5
- $\text{TRIS}\cdot\text{HCl}$ 2.5 y $5.0\cdot 10^{-2}\text{M}$ a pH 2.0

este último no tamponado.

En los estudios en función del pH se emplearon estos tres medios pero con una amplia gama de pH. Los distintos pH se prepararon de manera normalizada según R.A.Robinson.

a. Fosfato $5\cdot 10^{-2}\text{M}$ en un intervalo de pH que osciló entre 1.35 y 11.8, a partir de la mezcla de dos disoluciones Na_2HPO_4 y NaH_2PO_4 .

b. TRIS $5.0\cdot 10^{-2}\text{M}$ en un intervalo de pH que osciló entre 7 y 9.5, a partir de la mezcla entre dos disoluciones TRIS 0.1M y HCl 0.1M . Además se preparó otra disolución a pH 4.5 que no era tamponada.

c. TRIS $2.5 \cdot 10^{-2} \text{M}$ en un intervalo de pH desde 1.5 a 12.0. Hay que señalar que para $\text{pH} < 7$ y $\text{pH} > 10$ las disoluciones no están tamponadas.

Las disoluciones empleadas se mencionarán en el apartado correspondiente.

- Ensayos con TRIS

Se emplearon varias disoluciones de TRIS·HCl a pH 7.5 en un intervalo de concentración de $5 \cdot 10^{-3}$ a $5 \cdot 10^{-2} \text{M}$.

Se analizó la interacción del TRIS con dos disoluciones, $8.83 \cdot 10^{-4} \text{M}$ y $1.12 \cdot 10^{-3} \text{M}$ de ZnCl_2 .

CISTEINA

- Influencia del medio. Se analizaron tres disoluciones de cisteína en cada uno de los tipos de medios estudiados a pH 7.5.

- Influencia del pH. Se preparó una disolución de cisteína de la siguiente forma: se pesaron 60.6 mg de cisteína y se llevaron a 5 mL de TRIS·HCl pH 7.0, se purga con nitrógeno, se añaden 40 mL de H_2O y se vuelve a purgar para eliminar todo el oxígeno y, así, disminuir la posibilidad de oxidación de la cisteína. Se obtuvo así una disolución de concentración 10^{-1}M . A partir de esta disolución madre se preparan disoluciones $2 \cdot 10^{-4} \text{M}$ para cada uno de los pH estudiados para TRIS $5.0 \cdot 10^{-2} \text{M}$ (b).

- Adiciones de CdCl_2 o ZnCl_2 a cisteína. Se preparó una disolución de CdCl_2 estándar que se adicionó en cantidades que oscilaron entre 0 y $3.96 \cdot 10^{-4} \text{M}$ en una disolución de cisteína $8.11 \cdot 10^{-4} \text{M}$, que por efecto de las sucesivas diluciones pasó, a $4.63 \cdot 10^{-4} \text{M}$, en TRIS $2.5 \cdot 10^{-2} \text{M}$ y pH 7.5.

Análogamente se adiciona ZnCl_2 , en concentraciones de Zn^{2+} entre 0 y $14 \cdot 10^{-4} \text{M}$ lo que implicó que la concentración de cisteína se fuera diluyendo desde $8.11 \cdot 10^{-4}$ a $3.0 \cdot 10^{-4} \text{M}$.

En el medio $\text{TRIS} \cdot \text{HCl}$ $5.0 \cdot 10^{-2} \text{M}$ el rango de concentraciones utilizado es 0 y $7.79 \cdot 10^{-4} \text{M}$ para el cadmio y 0 y $4.22 \cdot 10^{-4} \text{M}$ para el zinc y $8.28 \cdot 10^{-4}$ a $4.28 \cdot 10^{-4} \text{M}$ para la cisteína.

- Influencia de la concentración. En el estudio de la absorbancia en función de la concentración de cisteína se prepararon varias disoluciones con intervalos de concentración que oscilaron para cada uno de los dos medios:

- en fosfato 0.1M pH 6.75, la concentración fue de 0.9 a $2.53 \cdot 10^{-4} \text{M}$
- en TRIS $2.5 \cdot 10^{-2} \text{M}$ pH 7.5, de 1.65 - $2.74 \cdot 10^{-4} \text{M}$.

FRAGMENTO

- Influencia del medio. Se prepararon varias disoluciones de fragmento $2.65 \cdot 10^{-2} \text{M}$ en cada uno de los tres tipos de medios estudiados a pH=7.4-7.5.

- Influencia del pH. Se prepararon varias disoluciones de fragmento de un orden de concentración $2.3-8.8 \cdot 10^{-5} \text{M}$ en cada una de las serie de pH correspondientes a cada medio (a,b,c).

- Adiciones de CdCl_2 y ZnCl_2 . En los estudios de sucesivas adiciones de CdCl_2 y ZnCl_2 a una disolución de fragmento se emplearon los tres tipos de medios: $\text{TRIS} \cdot \text{HCl}$ $2.5 \cdot 10^{-2} \text{M}$, $5.0 \cdot 10^{-2} \text{M}$ y fosfato $5.0 \cdot 10^{-2} \text{M}$. Las concentraciones de cada uno de los cationes, Cd^{2+} o Zn^{2+} , añadidas se indicarán en cada caso cuando se refiera dicho estudio.

- Influencia de la concentración. En los estudios de absorbancia en función de la concentración se emplearon concentraciones crecientes de fragmento, que se especificarán en

el apartado correspondiente y que se prepararon en TRIS·HCl pH 7.5 a dos concentraciones $2.5 \cdot 10^{-2}M$, $5.0 \cdot 10^{-2}M$.

METALOTIONEINAS

- Estabilidad. Se preparó una disolución $1.33 \cdot 10^{-3}M$ de MT "rabbit liver" M7641 lot. 20H9650 en TRIS·HCl $2.5 \cdot 10^{-2}M$ y pH 7.5. Entre lecturas la muestra se mantuvo siempre en frigorífico (4°C).

- Influencia del medio. Se prepararon varias disoluciones de MT en cada uno de los tres tipos de medio, fosfato o TRIS a ambas concentraciones. Las concentraciones de MT utilizadas en cada caso se indicarán cuando se analice este estudio.

- Estudios en función del pH. Se prepararon varias disoluciones de MT, cuyas concentraciones se indicaron en cada caso, en cada una de las tres series de pH preparadas para fosfato y TRIS a las dos concentraciones (a,b,c).

- Reversibilidad de la MT en función del pH. Se preparó una disolución $7.69 \cdot 10^{-6}M$ de MT r.l. en TRIS·HCl $2.5 \cdot 10^{-2}M$ se partió de pH 9.0 y se fué disminuyendo el pH, con la adición de cantidades despreciables de HCl, hasta pH 1.72. La posterior recuperación de pH neutros se realizó mediante la adición de NaOH en cantidades despreciables.

- Adiciones de $CdCl_2$ y $ZnCl_2$. En los estudios de las sucesivas adiciones de $CdCl_2$ y $ZnCl_2$ a una disolución de metalotioneína se emplearon los tres tipos de medios, fosfato y TRIS en las dos concentraciones. Las concentraciones de cada uno de los cationes añadidas se indicarán cuando se refiera dicho estudio.

- Influencia de la concentración. Para analizar la absorbancia en función de la concentración de MT, se prepararon

diferentes disoluciones en cada uno de los medios estudiados. Las concentraciones se indicaran cuando se desarrolle el apartado correspondiente a este punto. Así, como las concentraciones de las cinco MT, cuyo intervalo oscila entre 0.45 y $1.12 \cdot 10^{-2} \text{g/L}$, preparadas todas ellas de forma análoga en $\text{TRIS} \cdot \text{HCl}$ $2.5 \cdot 10^{-2} \text{M}$ y $\text{pH } 7.5$.

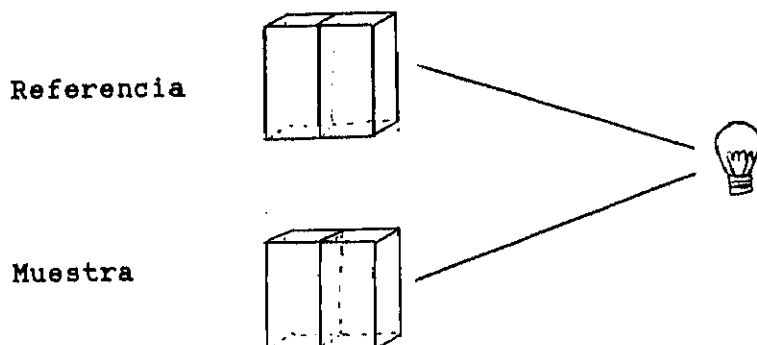
IV.B.4. MODO OPERATORIO

Las cubetas se lavan con mezcla crómica y posteriormente con agua y etanol, ya que las metalotioneínas se adhieren a la pared. Las cubetas utilizadas son de cuarzo.

Los ensayos se realizan entre dos longitudes de onda para las que las muestras presentan absorbancia.

Sistemáticamente se realizaron lecturas de "blanco" frente a "blanco" para poder realizar una corrección de fondo, cuando se lean las muestras problemas. Seguidamente se realiza la lectura de la muestra frente al blanco.

El ensayo para comprobar la influencia de la concentración del medio es más complejo. En primer lugar, se hacen lecturas del medio empleado a una concentración dada frente a agua, o al mismo medio. En segundo lugar, se emplean cuatro cubetas, dos en el compartimento de la muestra y otras dos en el del blanco, tal y como se indica en el siguiente esquema:



- 1) TRIS·HCl $5.0 \cdot 10^{-1}M$
- 2) H_2O
- 3) TRIS·HCl $2.5 \cdot 10^{-1}M$
- 4) TRIS·HCl $2.5 \cdot 10^{-1}M$

Se leen 1 y 2 como referencia, frente a 3 y 4 como muestra y luego al revés, 3 y 4 como referencia frente a 1 y 2 como muestra.

Otros ensayos realizados y que deben especificarse en este apartado son los realizados en atmósfera inerte. En este caso se trabajó en una caja de guantes en la que se introdujo el aparato de medida, espectrofotómetro de absorción molecular UV, junto con todo el material necesario para realizar los ensayos, pipetas, micropipetas, puntas, disoluciones, cubetas, etc. Esta caja de guantes se mantuvo en atmósfera inerte mediante un flujo constante de nitrógeno y así eliminar el oxígeno existente que podía provocar interferencias en la región cercana a los 190-200nm.

IV.C. RESULTADOS Y DISCUSION

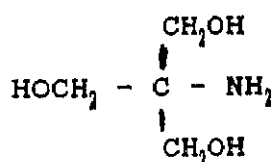
En este apartado se exponen los resultados obtenidos para la cisteína, el fragmento y las cinco metalotioneínas, por este orden, ya que se tomó como criterio de clasificación la complejidad de la molécula. Para cada uno de los compuestos se realizó un estudio en función de varios factores como son el medio utilizado para disolver la muestra, el pH del mismo, el efecto de la adición de cantidades crecientes de cationes metálicos o la concentración del propio compuesto estudiado.

Debe señalarse el hecho de que la zona de longitudes más interesante a la cual este tipo de compuestos presentan una absorción característica es próxima a 200 nm. Por lo tanto, esta zona se encuentra cercana al límite del ultravioleta, en la zona en la que el oxígeno presente en el ambiente puede interferir en las lecturas. Estos factores hacen que el espectro presente, en esta zona, oscilaciones y que no esté totalmente bien definido.

Otro aspecto a considerar es que las absorciones no son debidas a un único tipo de enlace, sino que son el resultado de la aportación de diferentes compuestos, así en la absorción a unos 200 nm aportan sus efectos, las amidas primarias, secundarias, los grupos tiólicos libres, el grupo carboxílico y, en menor medida, los hidroxilos.

IV.C.1. ESTUDIO DEL MEDIO UTILIZADO.

El TRIS, tri(hidroximetil) aminometano, es una molécula orgánica de fórmula:



que puede presentar absorción en la región UV estudiada. Con el objeto de comprobar la influencia de este compuesto que constituye parte del medio utilizado y, en particular, realizar la comparación de efectos obtenidos con dos concentraciones diferentes se ha realizado un estudio preliminar $A = f(\lambda)$ de este compuesto en condiciones diferentes.

En la figura 9 se muestra la absorción de TRIS·HCl en el ultravioleta cuando se lee frente a agua en la cubeta de referencia. Se puede observar que efectivamente el TRIS presenta una banda de absorción en la región estudiada. La forma de esta banda depende de la concentración, es más ancha y se desplaza hacia longitudes de onda mayores a medida que la concentración aumenta. Cabe señalar que la respuesta en absorbancia, a una longitud de onda dada, no varía linealmente en función de la concentración empleada.

Se han efectuado otros ensayos con el objeto de comprobar la influencia de la concentración del TRIS en presencia de MT. En este caso se emplean cuatro cubetas, en lugar de las dos que se usan corrientemente, dos en el compartimento de la muestra y dos en la referencia como se ha expuesto en la parte experimental de este capítulo.

Los efectos de absorción se muestran en la figura 10, (2') representa la línea de base al medir la muestra (1 cubeta) frente a referencia (1 cubeta) que contienen disoluciones idénticas. Este resultado es comparable al obtenido en (2) al medir la absorbancia de dos cubetas, como muestra, una que contiene TRIS·HCl $5 \cdot 10^{-2} M$ y la otra agua, frente a dos cubetas, como referencia que contienen cada una de ellas TRIS a una concentración mitad que la precedente. Se observa que las respuestas son aditivas y que, en este caso, el espectro es similar al obtenido en (2).

Con el mismo dispositivo de cuatro cubetas se realizan los espectros (1) y (1') con una cantidad dada de MT. La suma de

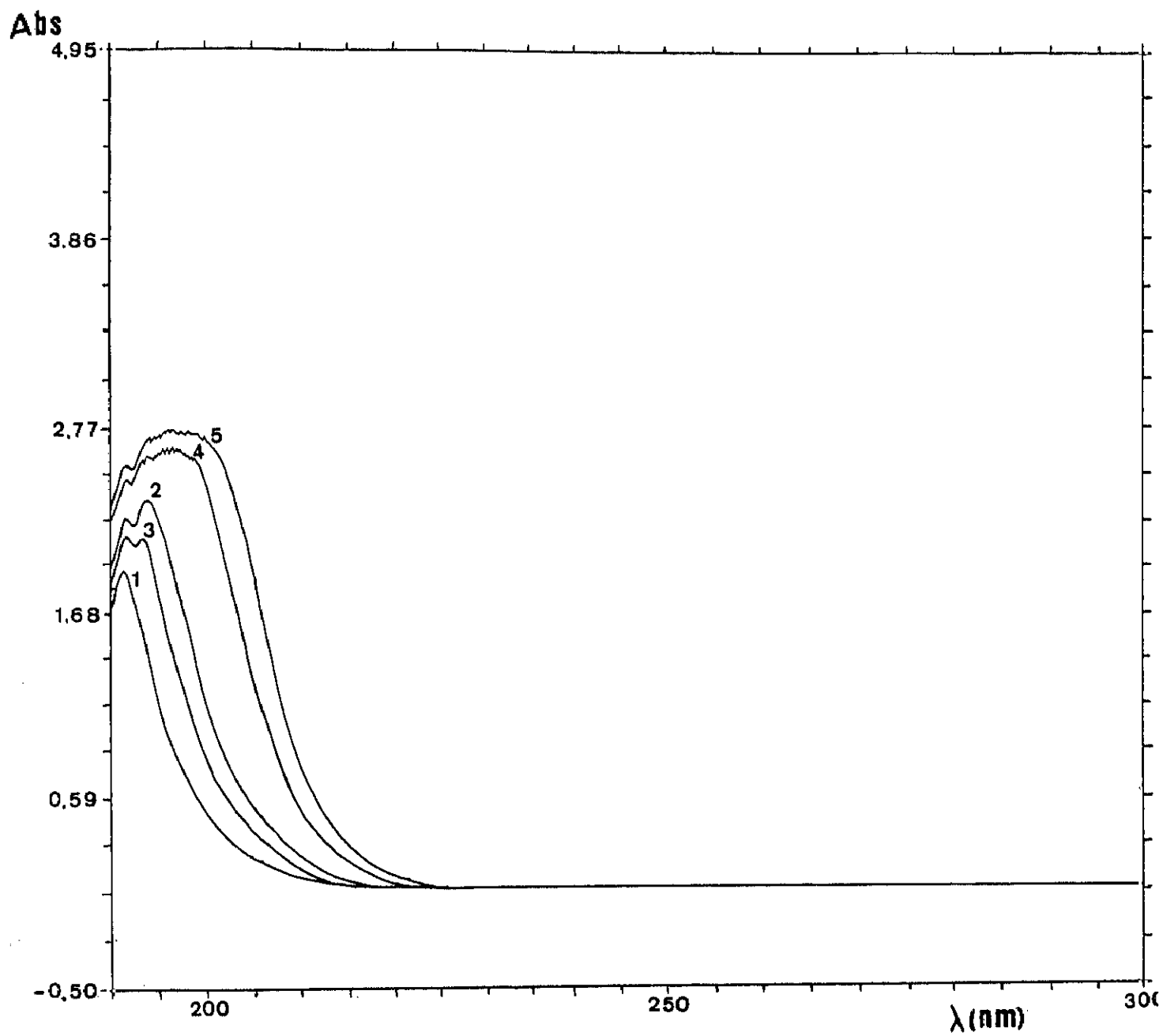


Fig.9 Espectros de Absorción Ultravioleta de TRIS HCl a diferentes concentraciones: 1) 5.0×10^{-3} M, 2) 1.24×10^{-2} M, 3) 2.5×10^{-2} M, 4) 3.33×10^{-2} M y 5) 5.0×10^{-2} M frente a H₂O como blanco.

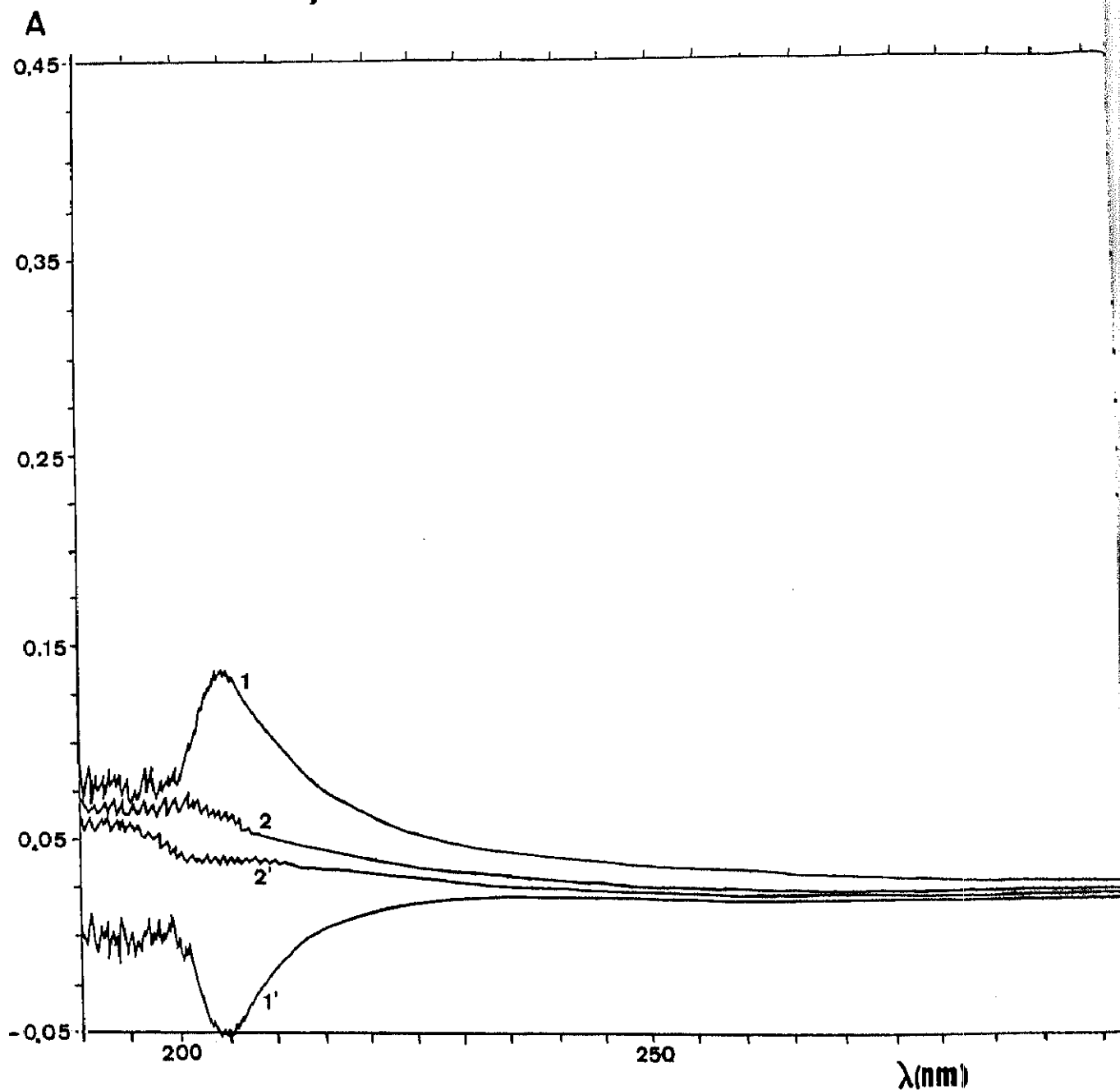


Fig. 10 Espectros de Absorción Ultravioleta con 4 cubetas:

- 1) Ref.: 2 cubetas con TRIS $2.5 \cdot 10^{-2}\text{M}$ + MT $6.25 \cdot 10^{-7}\text{M}$
 Muest.: (TRIS HCl $5.0 \cdot 10^{-2}\text{M}$ + MT $1.25 \cdot 10^{-6}\text{M}$) + H_2O
- 1') Ref.: (TRIS HCl $5.0 \cdot 10^{-2}\text{M}$ + MT $1.25 \cdot 10^{-6}\text{M}$) + H_2O
 Muest.: 2 cubetas TRIS $2.5 \cdot 10^{-2}\text{M}$ + MT $6.25 \cdot 10^{-7}\text{M}$
- 2) Ref.: 2 cubetas con TRIS $2.5 \cdot 10^{-2}\text{M}$
 Muest.: (TRIS HCl $5.0 \cdot 10^{-2}\text{M}$) + H_2O
- 2') Ref.: TRIS HCl $2.5 \cdot 10^{-2}\text{M}$
 Muest.: TRIS HCl $2.5 \cdot 10^{-2}\text{M}$

concentración MT y TRIS es análoga en cada uno de los caminos ópticos. Sin embargo, en presencia de MT se obtiene una pequeña señal de absorbancia. Es probable que el aumento de concentración produzca un aumento de la solubilidad de la MT y se genere un apantallamiento de los electrones en las capas exteriores y por tanto la absorción es menor.

Otro ensayo realizado fue la comprobación de la posible interacción entre los cationes metálicos libres y el TRIS, ya que es una molécula orgánica que presenta un grupo amino libre y, por lo tanto, con capacidad para formar complejos con los cationes metálicos libres.

Los resultados obtenidos para dos disoluciones, una de CdCl_2 y otra de ZnCl_2 en $\text{TRIS} \cdot \text{HCl}$ preparado a dos concentraciones diferentes 2.5 y $5.0 \cdot 10^{-1} \text{M}$ muestran que existe una absorción negativa al adicionar los cationes. Esto indica que, de alguna manera, existe una interacción cation-TRIS.

Tabla 18. Longitudes de onda y absorción que presenta una disolución de TRIS a dos concentraciones diferentes en presencia de diferentes cationes metálicos.

M E D I O	Cd^{2+}		Zn^{2+}	
	λ (nm)	A	λ (nm)	A
TRIS \cdot HCl $5.0 \cdot 10^{-1}$	208	-0.20	208	-0.24
TRIS \cdot HCl $2.5 \cdot 10^{-1}$	202.5	-0.18	202.5	-0.23

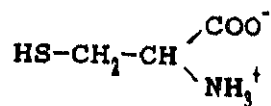
Cuando se representa en una tabla la longitud de onda del mínimo y su absorbancia frente a cada uno de los cationes, en cada medio, se puede comprobar (tabla 18) que la longitud de onda mínima de absorción no depende de la naturaleza del catión ya que

se obtiene el mínimo a la misma longitud de onda, para una concentración dada de TRIS para ambos cationes.

Existe una pequeña variación de la longitud de onda del mínimo para las dos concentraciones de TRIS estudiadas. Por otra parte la señal de absorbancia es análoga para un catión dado en los dos medios.

IV.C.2. CISTEINA

La cisteína es un aminoácido básico, cuya denominación sistemática es la de ácido α -amino- β -tiol-propionico, presenta tres funciones distintas, carboxílica, amino y tiólica. Por lo tanto, presenta características ácido-base derivadas de estos grupos.



CISTEINA

Aunque el grupo tiólico es ligeramente más ácido que el amino, al encontrarse tan próximos interaccionan, por lo que sólo se puede determinar una constante de acidez, próxima a 10^{-9} (138,71). Presenta además otra constante de acidez, la debida al grupo carboxílico que es próxima a 10^{-4} (138).

También es importante señalar que en medio neutro o básico, la cisteína es capaz de oxidarse formando mediante puentes disulfuro un dímero denominado cistina, que corresponde a la siguiente estructura:

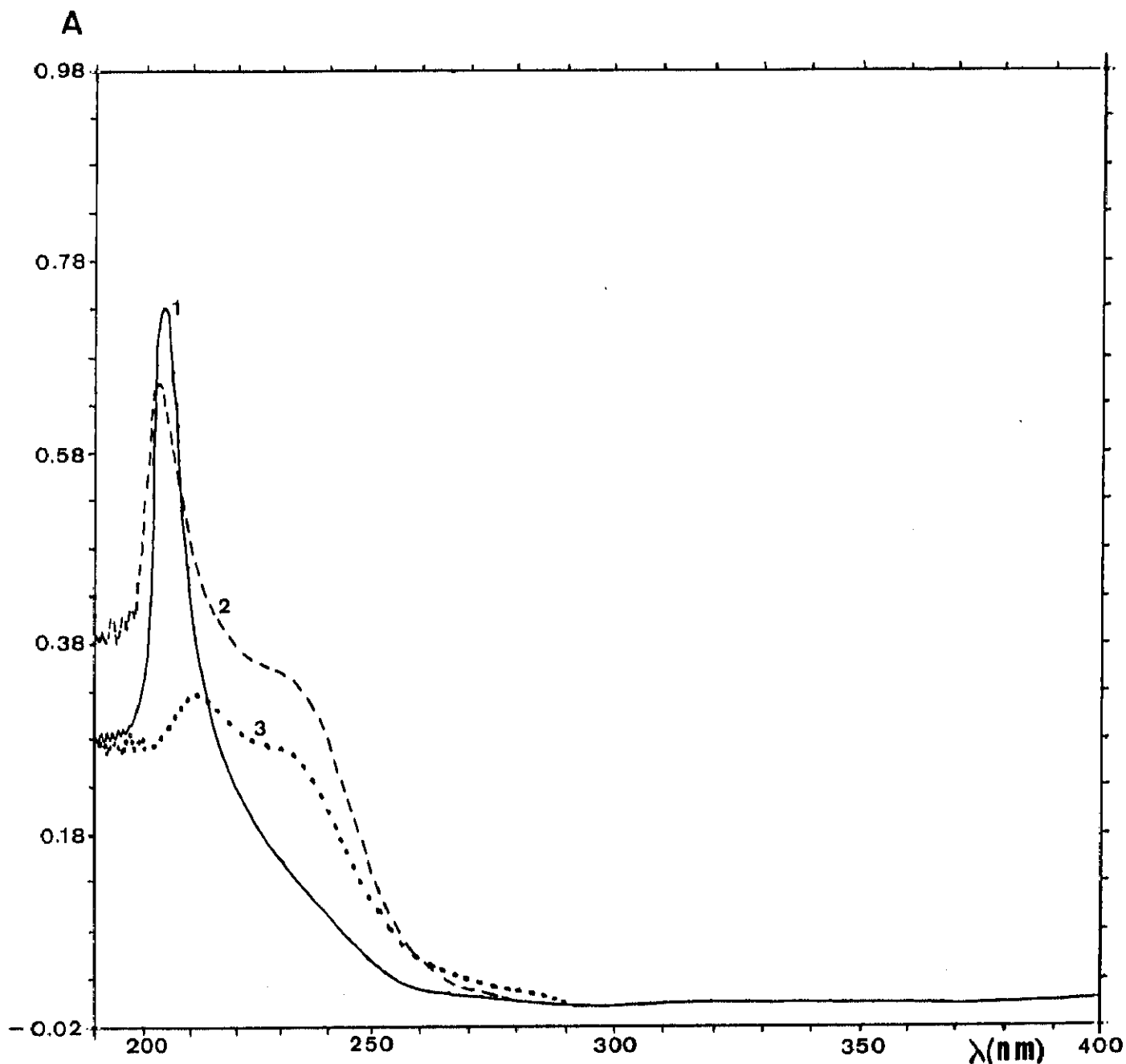
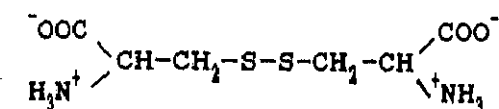


Fig.11 Espectros de Absorción en el Ultravioleta de una disolución de cisteína preparada en diferentes medios: 1) Cisteína $1.38 \cdot 10^{-3}\text{M}$ en fosfato 0.1 M pH 6.78, 2) Cisteína $7.51 \cdot 10^{-4}\text{M}$ en TRIS $2.5 \cdot 10^{-2}\text{M}$ pH 7.5 y 3) Cisteína $1.35 \cdot 10^{-3}\text{M}$ en TRIS $5.0 \cdot 10^{-2}\text{M}$



CISTINA

IV.C.2.A. INFLUENCIA DEL MEDIO

La influencia del medio en el espectro de absorción UV de la cisteína puede ser importante, por lo que, en este apartado, se presentan los resultados del estudio realizado en tres medios: tampón fosfato y tampón TRIS a dos concentraciones diferentes.

En la figura 11 se observa la variación que sufre el espectro de cisteína en función del tipo de medio en que se encuentra. La absorbancia para la longitud de onda (λ) del pico de absorción es mayor en medio TRIS que en fosfato ya que se obtienen señales análogas para una concentración de cisteína doble en fosfato que en TRIS. La diferencia más significativa entre los dos espectros es la aparición de un hombro a unos 230 nm aproximadamente en medio TRIS y que está totalmente ausente en medio fosfato. Parece claro que en medio TRIS existe una interacción entre la cisteína y el TRIS en disolución. Esta interacción se ve confirmada por el hecho de que al aumentar la concentración de TRIS en la disolución el hombro a 230 nm aumenta marcadamente con relación al pico situado a unos, 204 nm, tal y como se puede observar en la figura 11 (2,3). Al mismo tiempo, la absorbancia en el pico disminuye en el segundo caso en que la concentración de TRIS es doble de la primera.

La diferencia de absorción para las dos concentraciones de TRIS, que se encuentran en el medio, se puede explicar, al igual que se hizo en el caso anterior, porque el TRIS puede provocar un apantallamiento de los electrones exteriores de las capas externas y, por lo tanto, una disminución de la absorción. A este

pH neutro ambos compuestos, TRIS y cisteína, presentan estructuras con grupos funcionales capaces de interaccionar.

Como acabamos de decir, el hombro se ha atribuido a una interacción TRIS-cisteína, ya que éste no se presenta en medio fosfato. Sin embargo, el pico de absorción presente en todos los casos independientemente de la naturaleza del medio se debe a los grupos tiólicos existentes en la molécula. La presencia de este pico de absorción atribuido a los grupos tiólicos es fundamental para poder realizar, posteriormente, la comparación con la molécula del fragmento y de la metalotioneína, moléculas que presentan dichos grupos funcionales en su estructura.

IV.C.2.B. COMPORTAMIENTO EN FUNCION DEL pH

Se realizó un estudio, en los dos medios utilizados en el desarrollo de esta memoria, TRIS y fosfato del comportamiento espectrofotométrico de la cisteína en función del pH del medio.

a) Medio TRIS

Los espectros de absorción UV obtenidos a cada uno de los pH, incluidos en el intervalo 4.5 y 9.5, se muestran en la figuras 12. En la figura se observa claramente la existencia de dos perfiles completamente diferentes, a pH básicos presentan un máximo de absorción a una longitud de onda, λ , próxima a 230nm, mientras que a pH ácidos el máximo de absorción se sitúa a 201nm. Este desplazamiento batocrómico en función del pH es típico de la ionización del grupo causante de dicha señal de absorción. A medida que disminuye el pH la absorción a 230 nm desaparece y a pH cercanos a la neutralidad los perfiles son intermedios, presentando absorción a ambas longitudes de onda, 230 y 201 nm. La absorción a 230nm desaparece totalmente a pH 7.0.

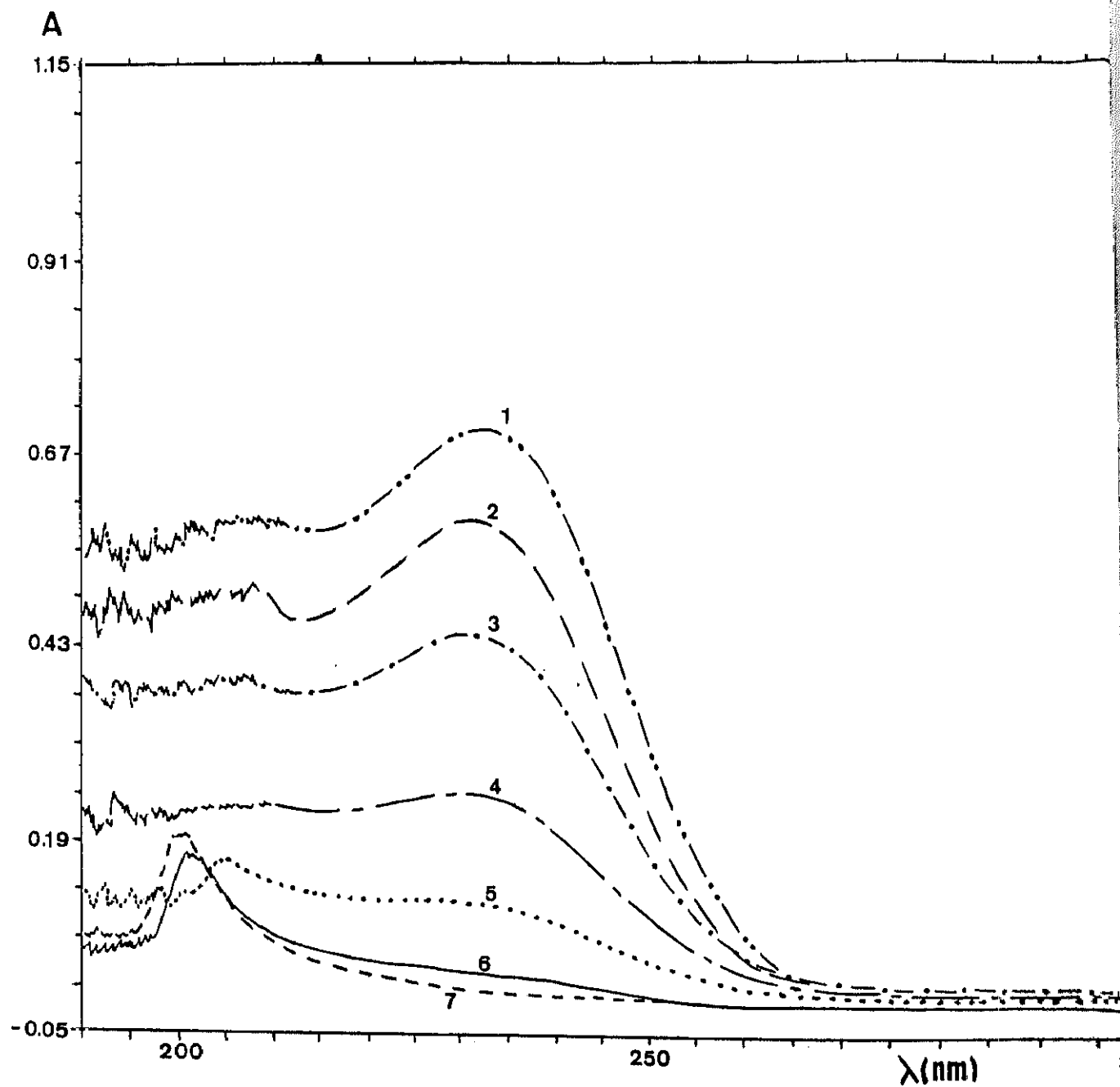


Fig.12 Espectro de Absorción Ultravioleta de una solución de cisteína $2 \cdot 10^{-4}\text{M}$ en tampón TRIS $5.0 \cdot 10^{-2}\text{M}$ a diferentes pH: 1) 9.5 , 2) 9.0 , 3) 8.5 , 4) 8.0 , 5) 7.5 , 6) 7.0 y 7) 4.5

**Absorbancia a 230 nm en función del pH
para una disolución de cisteína 0.2 mM**

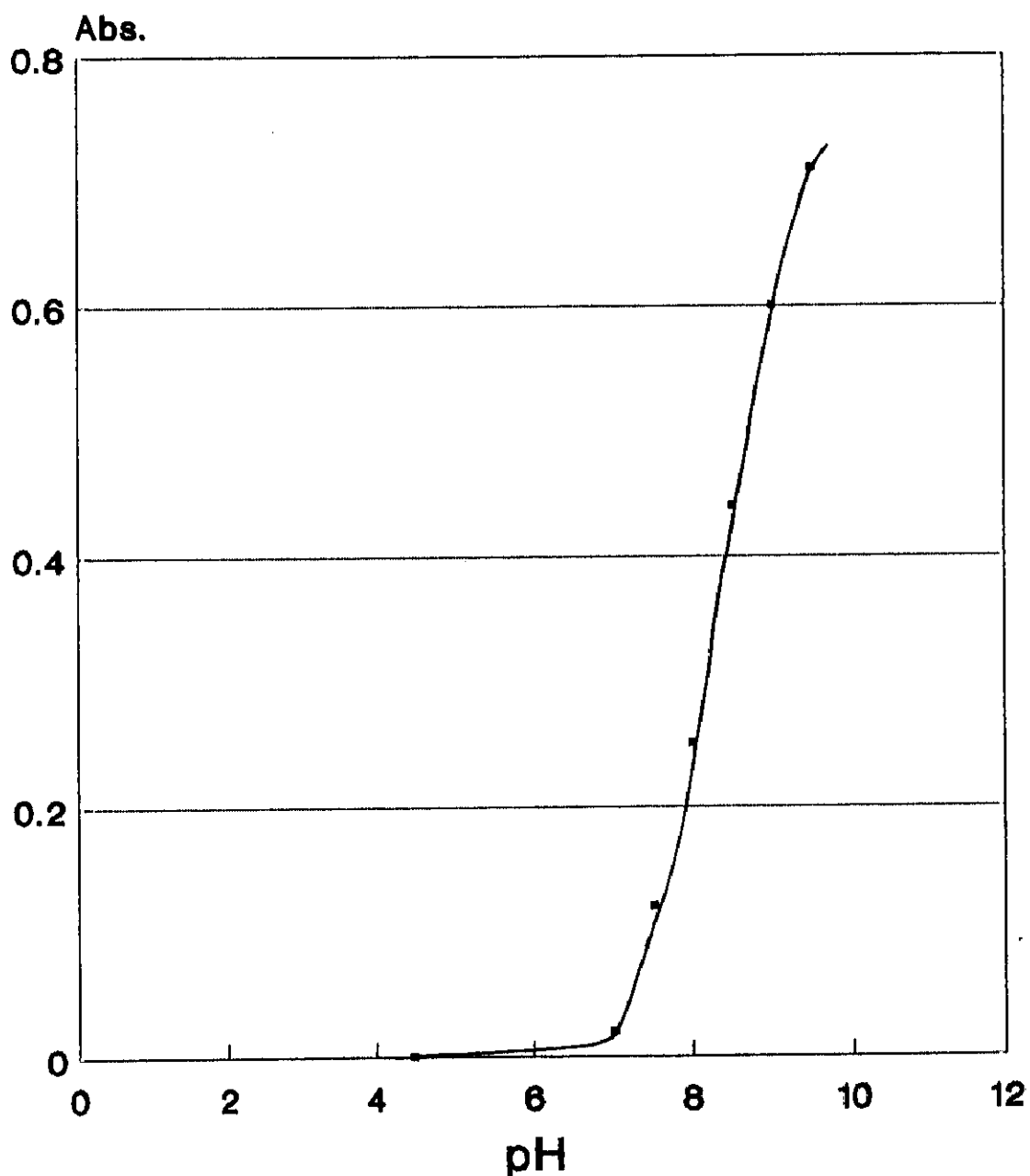


Fig.13 Absorbancia a 230nm en función del pH del medio TRIS $5.0 \cdot 10^{-2}M$ para una disolución $2 \cdot 10^{-4}M$ de cisteína

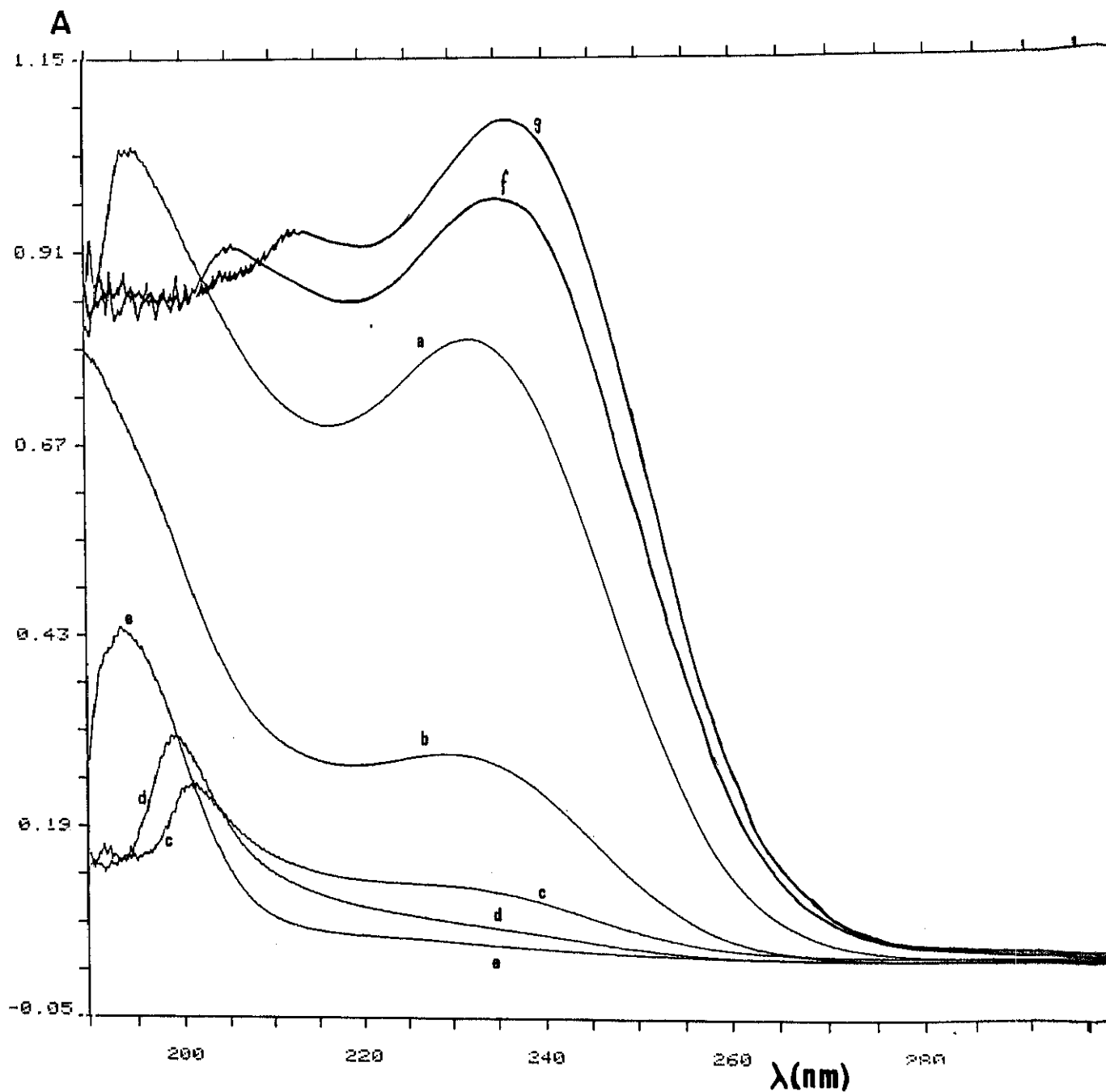


Fig. 14. Curvas de absorción U.V. de una disolución de cisteína $1.96 \cdot 10^{-4}$ M en medio fosfato a diferentes pH: a) 10, b) 9, c) 8, d) 7, e) 6, f) 11 y g) 12.

En la figura 13 se representa la absorbancia en función del pH para una longitud de onda 230nm.

Cualitativamente se puede indicar que existen dos compuestos diferentes en función del pH. A partir de los resultados obtenidos no se puede calcular el pK de disociación ácido-base de la cisteína; sólo se puede indicar que éste presenta un valor superior a 8, lo que está de acuerdo con los datos encontrados en la literatura (71).

b) Medio fosfato

Un estudio análogo se realizó en tampón fosfato, cuyos pH oscilaron entre 6 y 12, para una disolución de cisteína de concentración $1.96 \cdot 10^{-4}$.

Los resultados obtenidos (experiencias realizadas por el Dr. J.Chivot) se muestran en la figura 14 a y b. Se puede comprobar como el perfil se modifica totalmente en función del pH del medio, el perfil de la onda es totalmente diferente, mientras a pH básicos presenta dos picos claramente definidos, a pH ácidos sólo presenta un pico y la señal es mucho menor.

La evolución del espectro cuando se parte de pH básicos, hacia valores mas ácidos, pH 6.0, es la siguiente: a pH 12.0 presenta un máximo bien definido a 235-240 nm y otro máximo a unos 212 nm de menor intensidad; el primero de ellos, el situado a mayores longitudes de onda, comienza a disminuir rápidamente de señal hasta desaparecer a partir de pH 7.0, a la vez que se desplaza ligeramente hacia menores longitudes de onda. Sin embargo, el segundo máximo, 215 nm, aumenta rápidamente de señal a la vez que se desplaza también hacia menores longitudes de onda, pero de forma mucho mas importante. No obstante, a partir de pH 8.0 y según va disminuyendo éste, aparece un pico a unos 200 nm que a medida que baja el pH aumenta de señal y se desplaza ligeramente hacia λ mayores. Esto parece indicar que, en

Absorbancia a 210 y 230 nm en función del pH para una disolución de cisteína

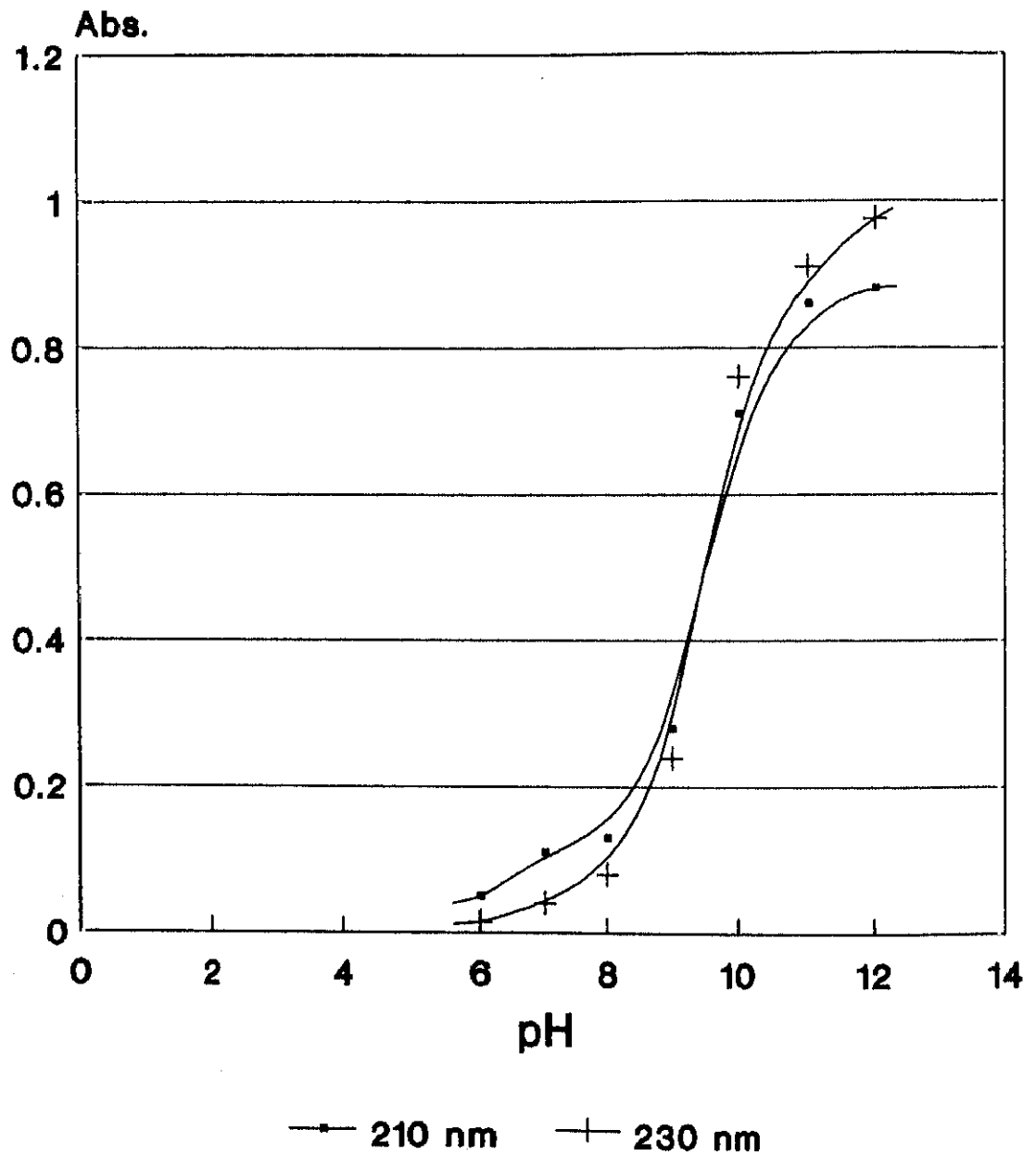


Fig. 15 Absorbancia a dos longitudes de onda diferentes, 210nm y 230 nm, en función del pH del medio TRIS $2.5 \cdot 10^{-2}M$ para la cisteína.

disolución y, dependiendo del pH, existen varias especies químicas diferentes.

Al representar la absorbancia en función del pH se obtuvo la gráfica de la figura 15. En ella se pueden observar dos especies claramente definidas una para pH mayores de 11.0 y otra para pH menores de 8.0, en la zona de pH intermedia coexisten ambas especies en diferente proporción. El pK_a aproximado de la cisteína parece tener un valor de $pK_a=9.5$, valor análogo al indicado en la bibliografía (310).

Cuando se compara en ambos medios el estudio realizado en función del pH se pueden observar claras analogías. En primer lugar se observa que en el intervalo estudiado existen, en ambos casos, dos especies químicas diferentes. El valor de pK_a obtenido es mayor en el caso del fosfato. La diferencia existente se debe probablemente a la interacción que presenta la cisteína con el TRIS y no con el fosfato.

IV.C.2.C. ADICIONES DE CATIONES METALICOS

En este apartado se describe un estudio del efecto de la adición de cationes metálicos divalentes, $Cd(II)$ o $Zn(II)$ a una disolución de cisteína preparada en dos medios diferentes, TRIS $2.5 \cdot 10^{-2}M$ y TRIS $5.0 \cdot 10^{-2}M$ ambos a pH 7.5.

Este estudio ha sido ya efectuado por numerosos autores, por lo que nosotros nos hemos limitado a realizar ensayos puntuales, no sistemáticos, que sirve para poder comparar los resultados con los obtenidos con el fragmento y con la metalotioneína.

a) Adiciones de CdCl_2

- $\text{TRIS} \cdot \text{HCl } 2.5 \cdot 10^{-1} \text{M}$

Los espectros resultantes de la adición de CdCl_2 a una disolución de cisteína en $\text{TRIS} \cdot \text{HCl } 2.5 \cdot 10^{-1} \text{M}$ se muestran en la figura 16. En ella se puede comprobar la evolución que sufren tras las sucesivas adiciones de cadmio. El espectro debido a la cisteína presenta un hombro a unos 232 nm, atribuido a la interacción con el TRIS, y un pico perfectamente definido a 205 nm aproximadamente, que se va modificando para dar lugar a otro con un máximo a 217 nm. Esta evolución da lugar a un punto isosbético, lo que indica la presencia de dos especies químicas diferentes de la cisteína con su grupo tiólico asociado o no a cationes cadmio.

Al representar la absorbancia en la longitud de onda correspondiente a los dos máximos existentes se obtienen las curvas de la figura 17, donde se ve la existencia de dos especies químicas diferentes, una que va desapareciendo y otra que va aumentando a medida que lo hacen las adiciones de cadmio. Se confirma, por lo tanto, la existencia de, al menos, dos especies químicas diferentes de cisteína en presencia o ausencia de dicho catión en la disolución.

- $\text{TRIS} \cdot \text{HCl } 5.0 \cdot 10^{-1} \text{M}$

Cuando el medio empleado es $\text{TRIS} \cdot \text{HCl } 5.0 \cdot 10^{-1} \text{M}$ se obtienen los espectros de la figura 18. Se puede observar que el pico de la cisteína, que en este medio aparece a 210 nm, tras la adición de CdCl_2 se desplaza a 214 nm. Este desplazamiento es inferior al que se produce en el caso anterior. Además, no aparece un punto isosbético. Por lo demás la evolución es similar, es decir aumenta la absorción en el nuevo máximo y en el hombro a 240nm como consecuencia de la adición de cadmio. Cuando se alcanza una relación de concentraciones Cd/cys aproximadamente 0.5, el perfil

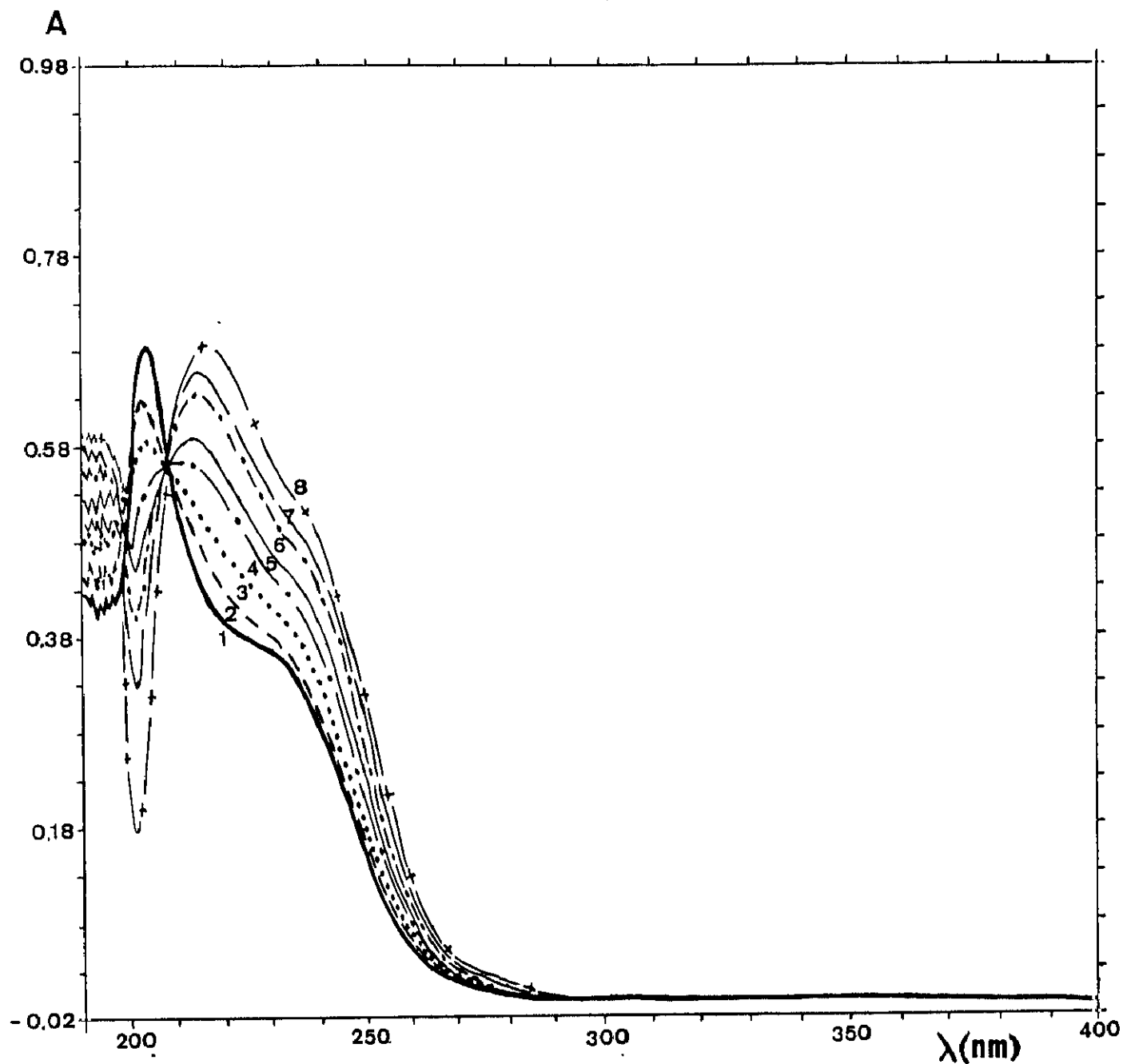


Fig.16 Variación del espectro ultravioleta de la cisteína ($8.11 \times 10^{-4} \text{ M}$) tras las sucesivas adiciones de CdCl_2 : 1) 0 M, 2) $0.59 \times 10^{-4} \text{ M}$, 3) $1.11 \times 10^{-4} \text{ M}$, 4) $1.57 \times 10^{-4} \text{ M}$, 5) $1.57 \times 10^{-4} \text{ M}$, 6) $2.5 \times 10^{-4} \text{ M}$, 7) $2.97 \times 10^{-4} \text{ M}$ y 8) $3.96 \times 10^{-4} \text{ M}$

Absorbancia a 205 y 220 nm en función del Cadmio añadido a la cisteína

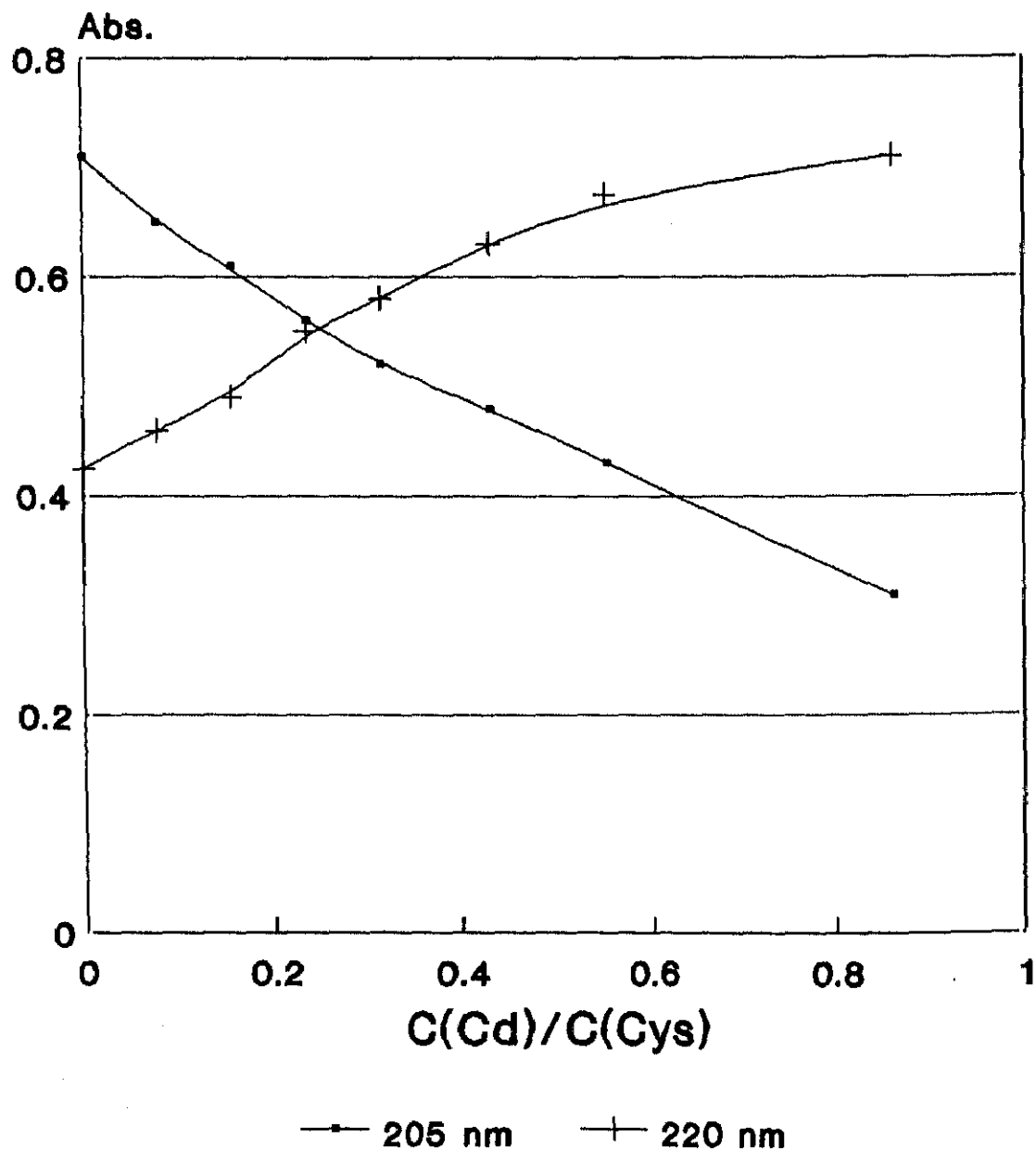


Fig.17 Absorbancia a dos longitudes de onda diferentes, 220 y 250 nm en función de la relación molar de concentraciones Cadmio/Cisteína.

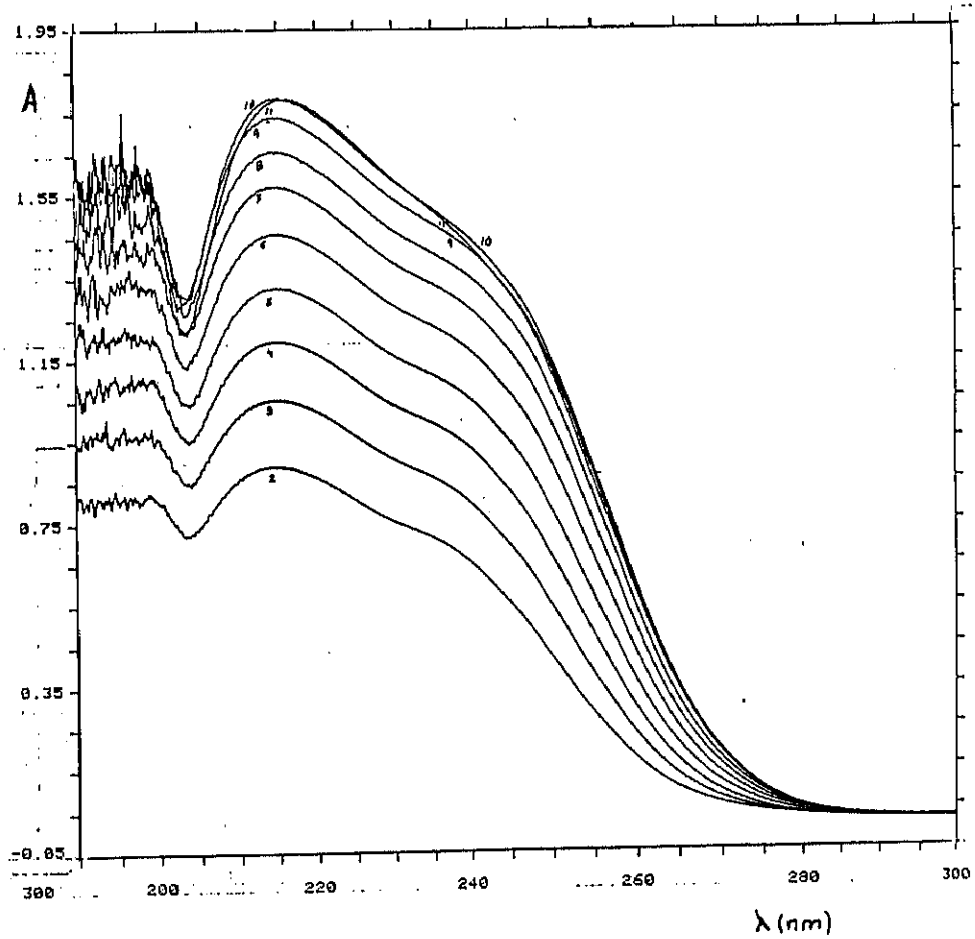
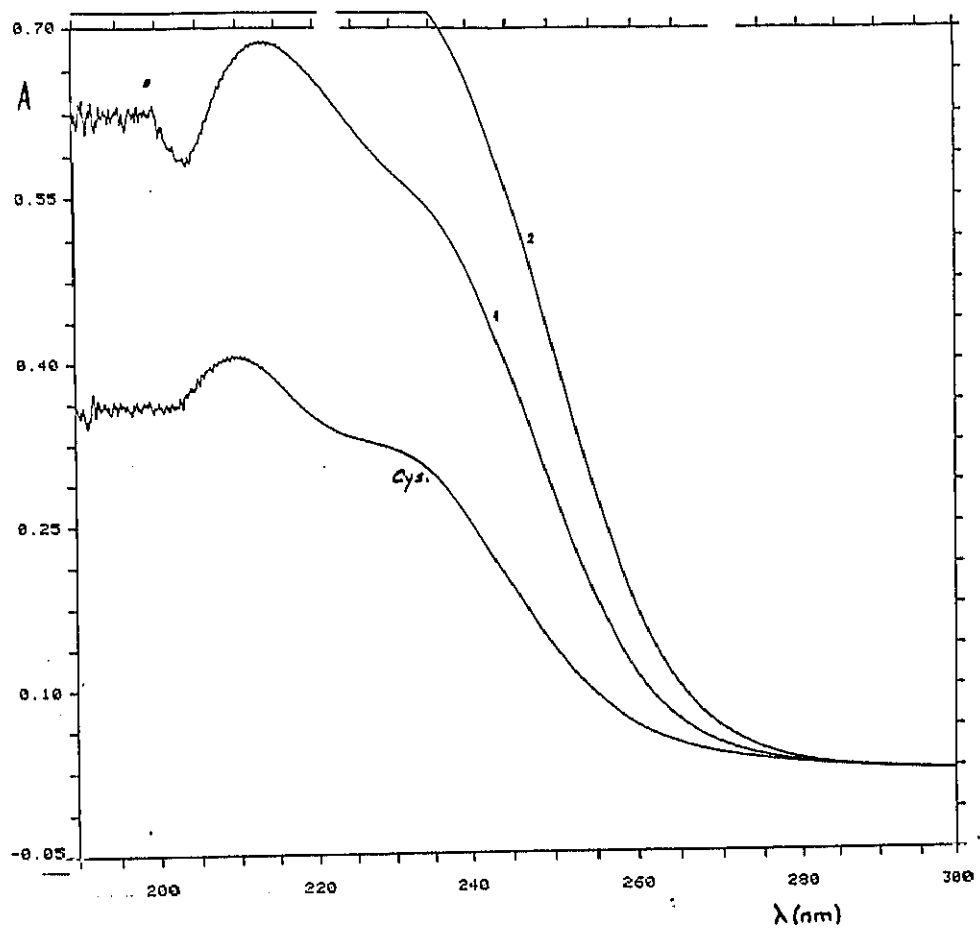


Fig 18

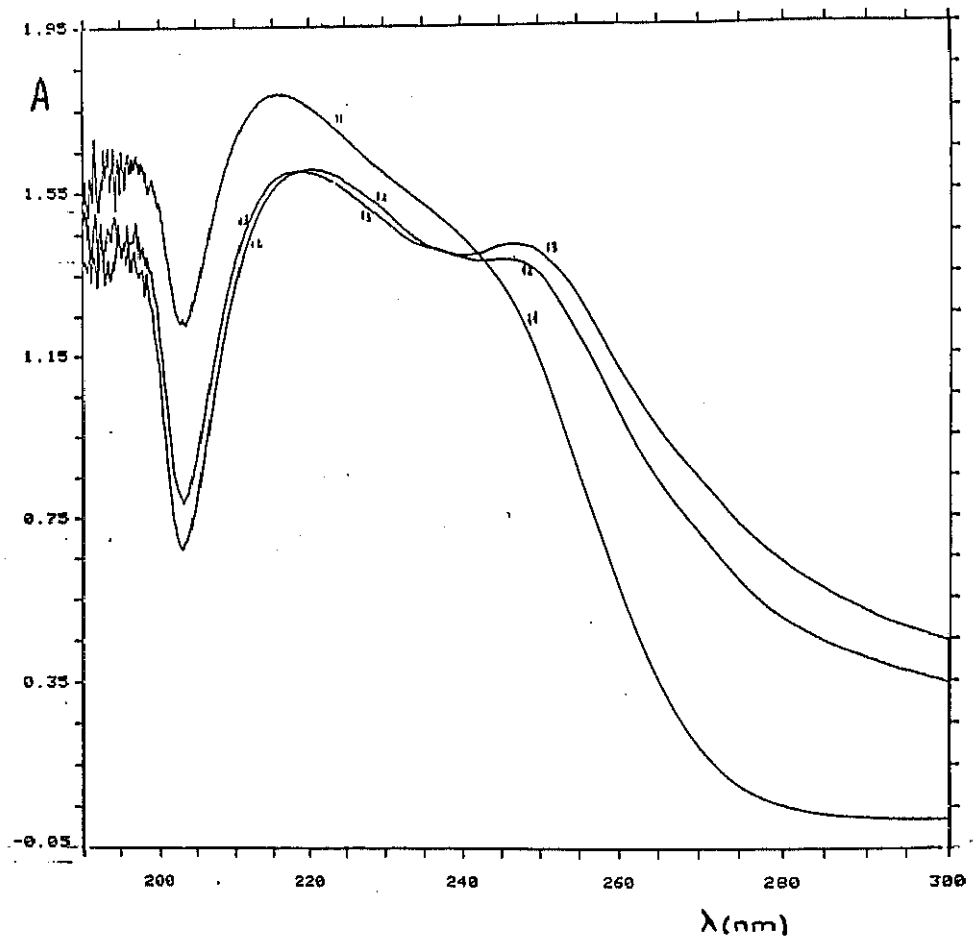


Fig.18' Espectros de absorción ultravioleta de una disolución $8.26 \cdot 10^{-4}M$ de cisteína tras las sucesivas adiciones de $CdCl_2$: 1) $0M$, 2) $0.266 \cdot 10^{-4}M$, 3) $0.515 \cdot 10^{-4}M$, 4) $0.749 \cdot 10^{-4}M$, 5) $0.969 \cdot 10^{-4}M$, 6) $1.18 \cdot 10^{-4}$, 7) $1.45 \cdot 10^{-4} M$, 8) $1.70 \cdot 10^{-4}M$, 9) $1.93 \cdot 10^{-4}M$, 10) $2.18 \cdot 10^{-4}M$, 11) $2.42 \cdot 10^{-4}M$, 12) $2.64 \cdot 10^{-4}M$, 13) $5.33 \cdot 10^{-4}M$ y 14) $7.79 \cdot 10^{-4}M$

del espectro vuelve a modificarse ligeramente, desplazándose el pico hacia longitudes de onda mayores y haciéndose menos pronunciado el hombro. Cuando la relación cadmio/cys es igual a 1 el espectro sufre una clara modificación, se vuelve a desplazar el pico del máximo de absorción.

De los espectros de la figura 18, se observa que existen tres perfiles diferentes que presentan máximos a 210, 214 y 220 nm, podría atribuirse cada uno a una especie química diferente procedente de los diferentes equilibrios de complejación cadmio-cisteína.

La modificación del perfil polarográfico debida a la adición de cadmio provoca una variación de la absorbancia en la longitud de onda atribuida al complejo cadmio-tiol, próxima a 250 nm y, en la longitud de onda correspondiente a la absorción de la cisteína en presencia de cadmio, 215 nm. En la figura 19 se muestra la variación obtenida. En ella se observa como la absorbancia en el máximo va aumentando a medida que lo hace la cantidad de cadmio existente en la disolución, hasta que a partir de una concentración de cadmio igual a la de cisteína existente, comienza a disminuir hasta estabilizarse. Por lo tanto, parece evidente que existen en disolución más de dos especies químicas diferentes, como hemos dicho anteriormente.

Del ensayo realizado sobre la influencia de la adición de cadmio a una disolución de cisteína se puede deducir, como principal conclusión, que existe una interacción entre ambos compuestos que se traduce en la aparición de un hombro de absorbancia a longitudes de onda próximas a 250 nm, que corresponde a los enlaces metal-tiolato. Por tanto, esta reacción se produce a través de los grupos tiólicos de la cisteína.

Absorbancia a 215 y 247 nm en función del Cadmio añadido a la cisteína

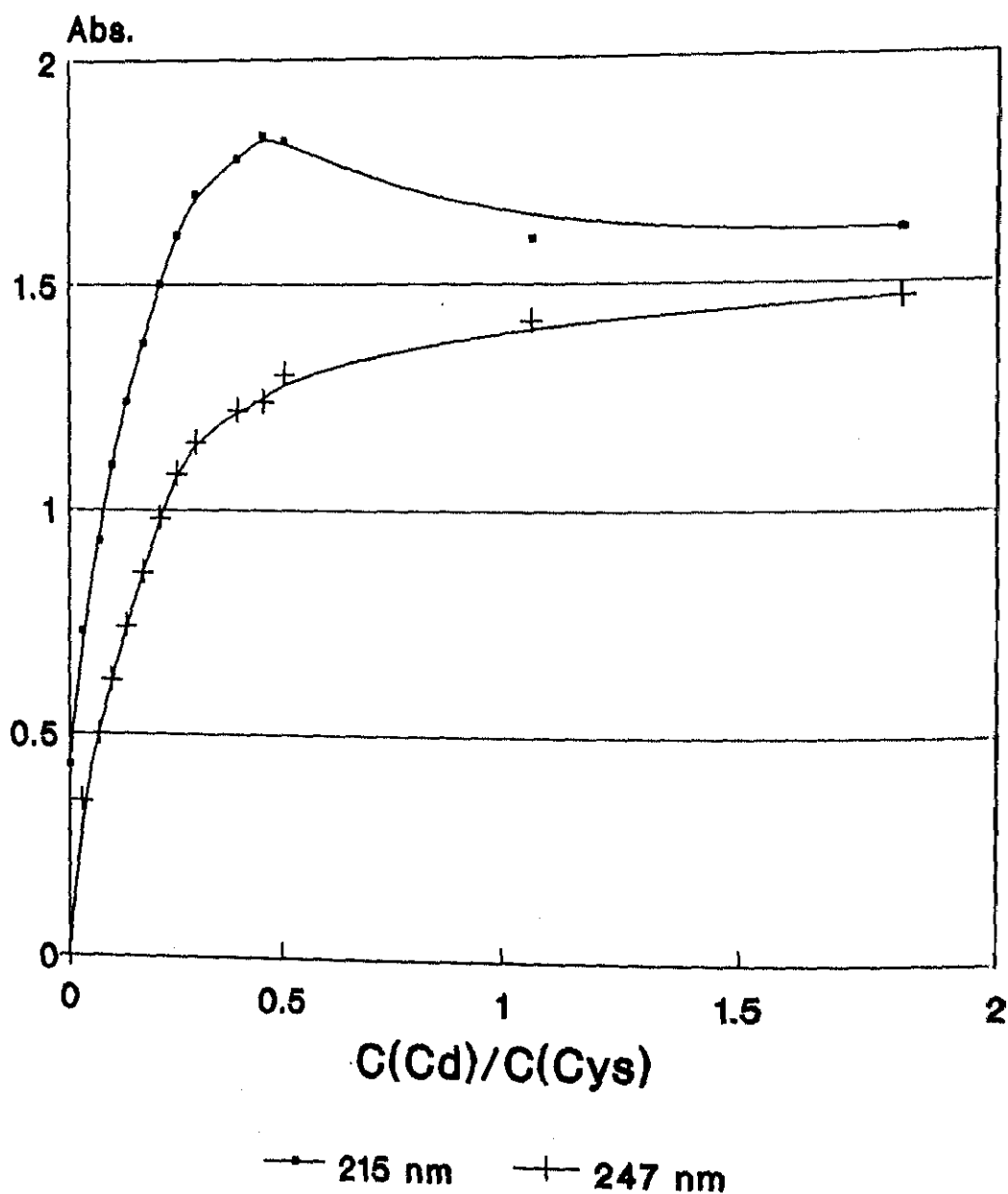


Fig.19 Absorbancia a dos longitudes de onda diferentes, 215 y 217nm, en función de la relación molar de concentraciones Cadmio/cisteína.

b) Adiciones patrón de ZnCl_2

La evolución del espectros U.V. de la cisteína tras sucesivas adiciones de ZnCl_2 , en TRIS $2.5 \cdot 10^{-2}\text{M}$ y TRIS $5.0 \cdot 10^{-2}\text{M}$, son análogos a los del cadmio y se muestran en la figuras 20 y 21.

- TRIS $2.5 \cdot 10^{-2}\text{M}$

La adición de sales de zinc sobre una disolución de cisteína provoca un desplazamiento del máximo de absorción desde los 204 nm a los 210 nm, como puede observarse en la figura 20. Este desplazamiento viene acompañado por un incremento en la absorbancia próxima a los 225 nm, correspondiente a los enlaces zinc-tiolato. Cuando la concentración de zinc es superior a dos veces la cantidad de cisteína presente en la muestra, el perfil espectrofotométrico de la disolución vuelve a modificarse y conlleva un segundo desplazamiento del máximo de absorción. Parece probable, por lo tanto, la existencia de más de dos especies químicas distintas en la disolución, procedentes de diferentes equilibrios químicos de complejación entre el zinc y la cisteína.

Cuando se representa la absorbancia a la longitud de onda correspondiente a los máximos de absorción en función de la relación de concentraciones zinc/cisteína se obtiene la representación de la figura 21. En ella se puede ver como la presencia de zinc en disolución provoca una disminución en el máximo de absorción correspondiente a la cisteína libre, a la vez que aumenta la absorbancia en el máximo atribuido al complejo zinc-cisteína, hasta que a partir de una relación de concentraciones superior a dos se hace constante.

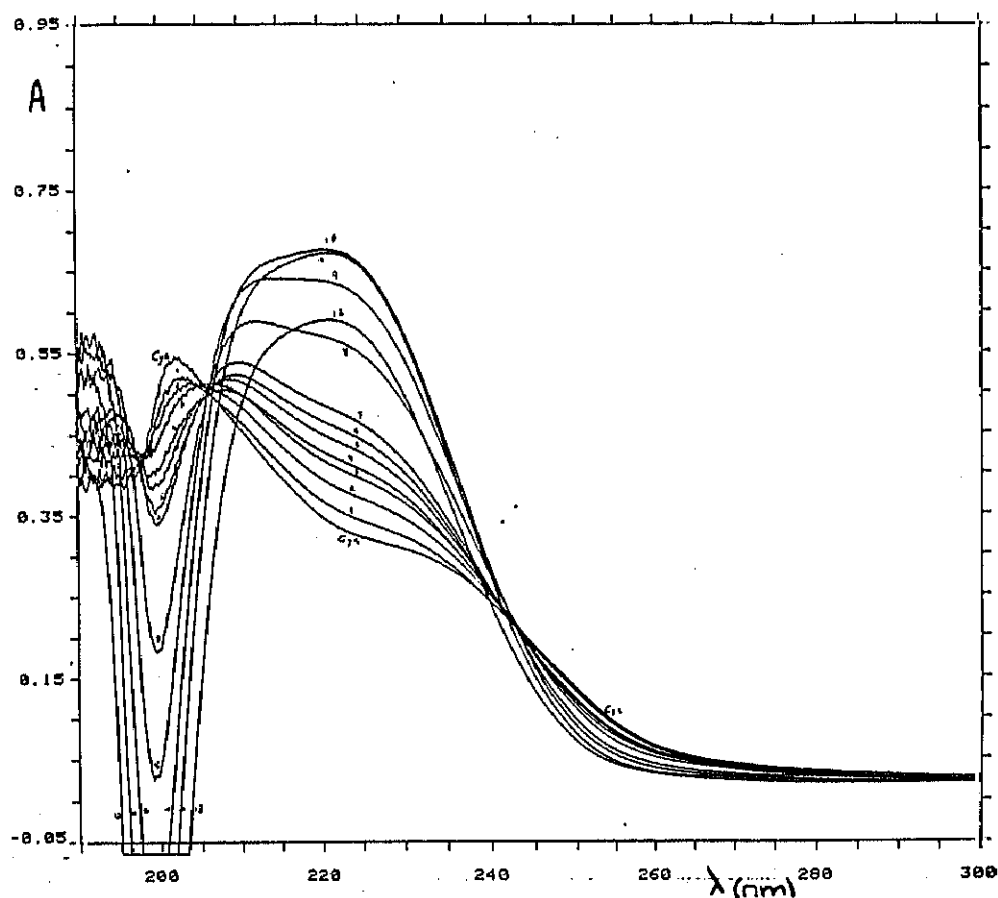


Fig.20 Variación de los espectros de absorción molecular ultravioleta de una disolución $8.11 \cdot 10^{-4}M$ de cisteína en TRIS $2.5 \cdot 10^{-2}M$, tras las sucesivas adiciones patrón de $ZnCl_2$: 1) $0 M$, 2) $5.3 \cdot 10^{-5}$, 3) $1.03 \cdot 10^{-4}$, 4) $1.49 \cdot 10^{-4}$, 5) $1.93 \cdot 10^{-4}$, 6) $2.33 \cdot 10^{-4}$, 7) $2.72 \cdot 10^{-4}$, 8) $3.08 \cdot 10^{-4}$, 9) $5.28 \cdot 10^{-4}$, 10) $7.48 \cdot 10^{-4}$, 11) $9.68 \cdot 10^{-4}$, 12) $1.18 \cdot 10^{-3}$ y 13) $1.4 \cdot 10^{-3}M$

Absorbancia a 202, 225 y 250 nm en función del Zinc añadido a la cisteína

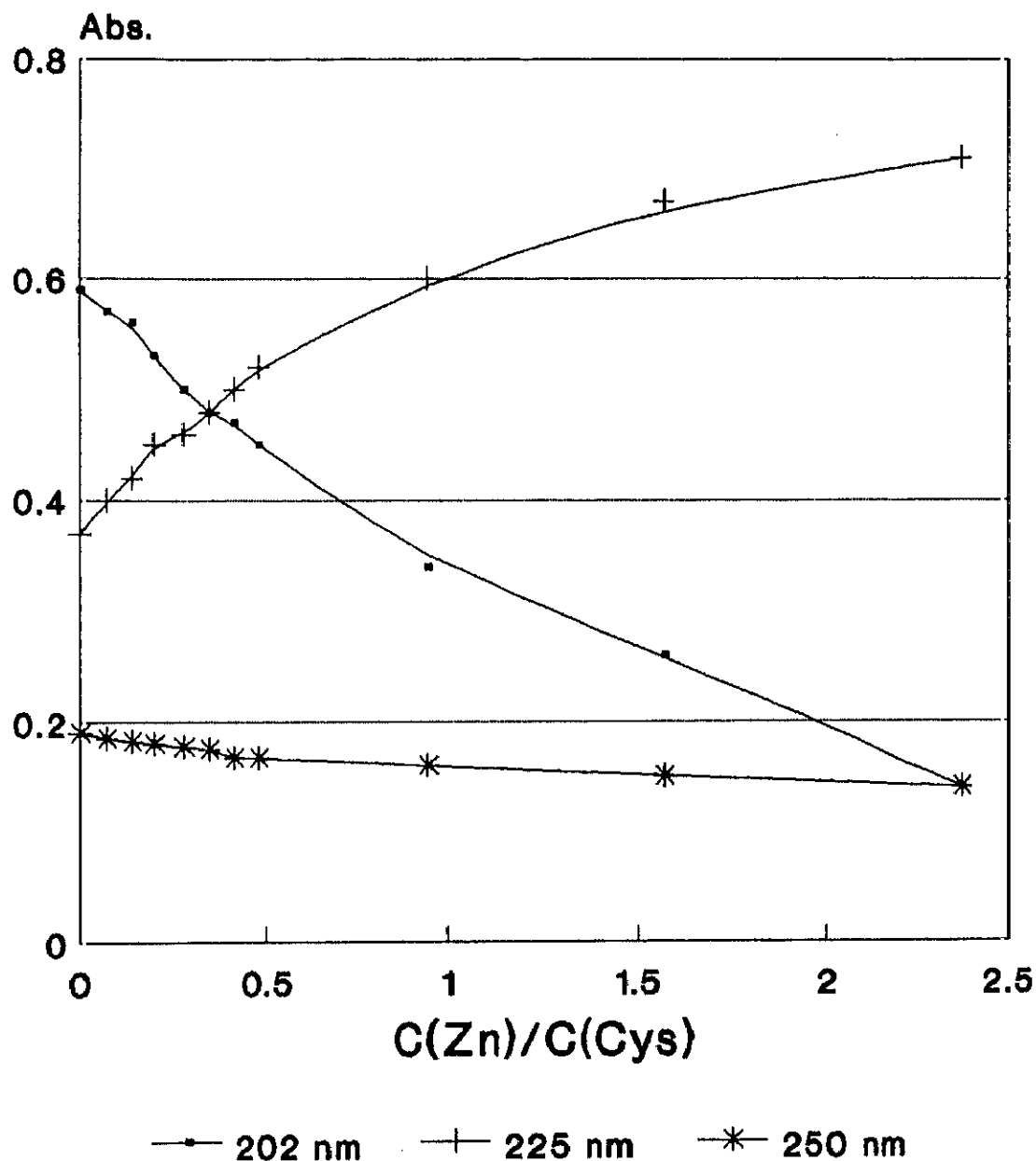


Fig. 21 Absorbancia en función de la relación molar de concentraciones Zinc/Cisteína a tres longitudes de onda diferentes: 202, 225 y 250nm.

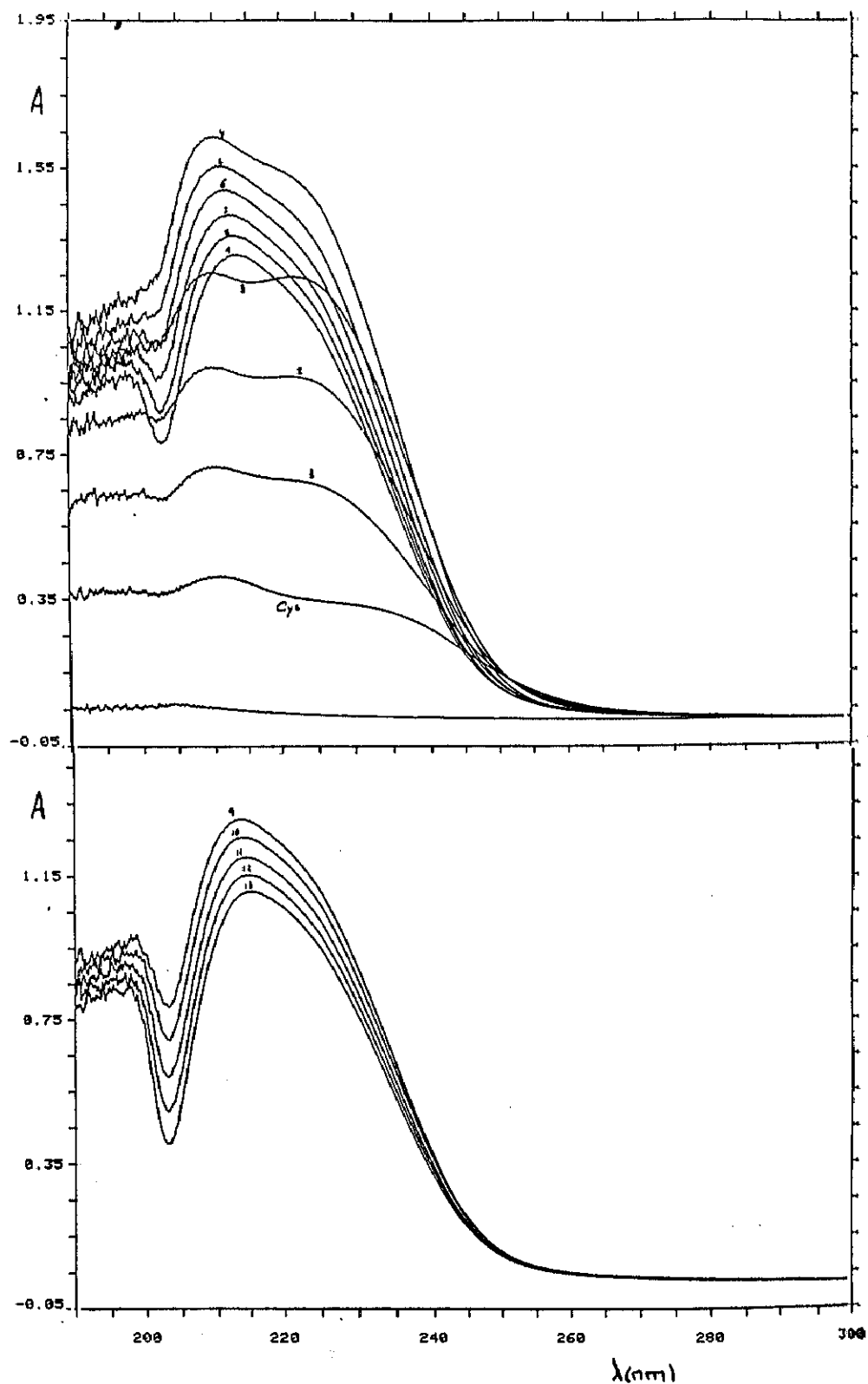


Fig. 22 Espectros de absorción molecular ultravioleta para una disolución de cisteína $8.26 \cdot 10^{-4}\text{M}$ tras las sucesivas adiciones patrón de ZnCl_2 : 1) 0 M, 2) $4.94 \cdot 10^{-5}\text{M}$, 3) $9.56 \cdot 10^{-5}\text{M}$, 4) $1.39 \cdot 10^{-4}\text{M}$, 5) $5.85 \cdot 10^{-4}\text{M}$, 6) $1.075 \cdot 10^{-3}\text{M}$, 7) $1.534 \cdot 10^{-3}\text{M}$, 8) $1.96 \cdot 10^{-3}\text{M}$, 9) $2.37 \cdot 10^{-3}\text{M}$, 10) $2.75 \cdot 10^{-3}\text{M}$, 11) $3.11 \cdot 10^{-3}\text{M}$, 12) $3.99 \cdot 10^{-3}\text{M}$, 13) $3.87 \cdot 10^{-3}\text{M}$ y 14) $4.2 \cdot 10^{-3}\text{M}$

Absorbancia a 210 y 227 nm en función del Zinc añadido a la cisteína

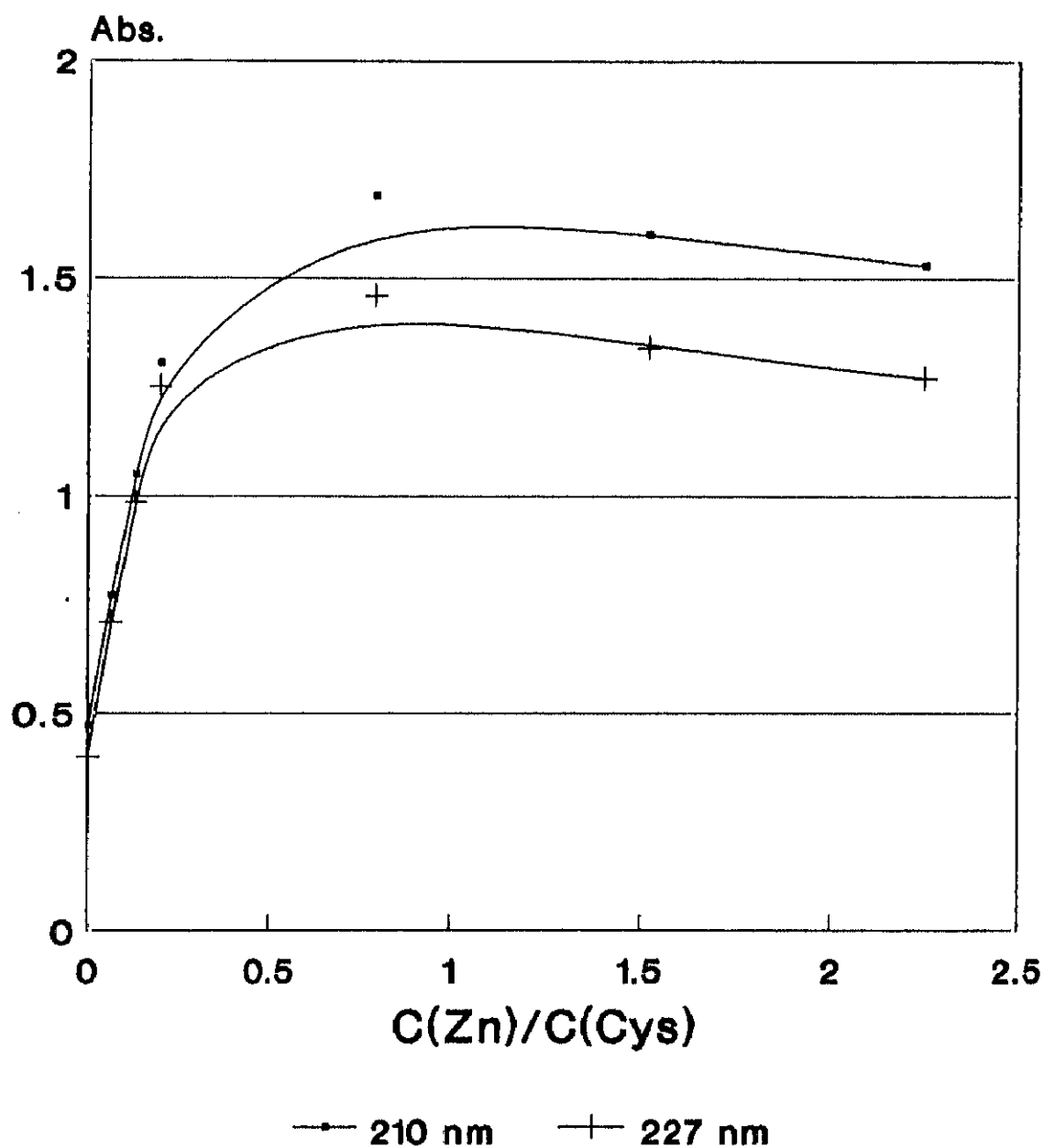


Fig. 23 Absorbancia a dos longitudes de onda diferentes, 210 y 227nm, en función de la relación molar de concentraciones Zinc/cisteína.

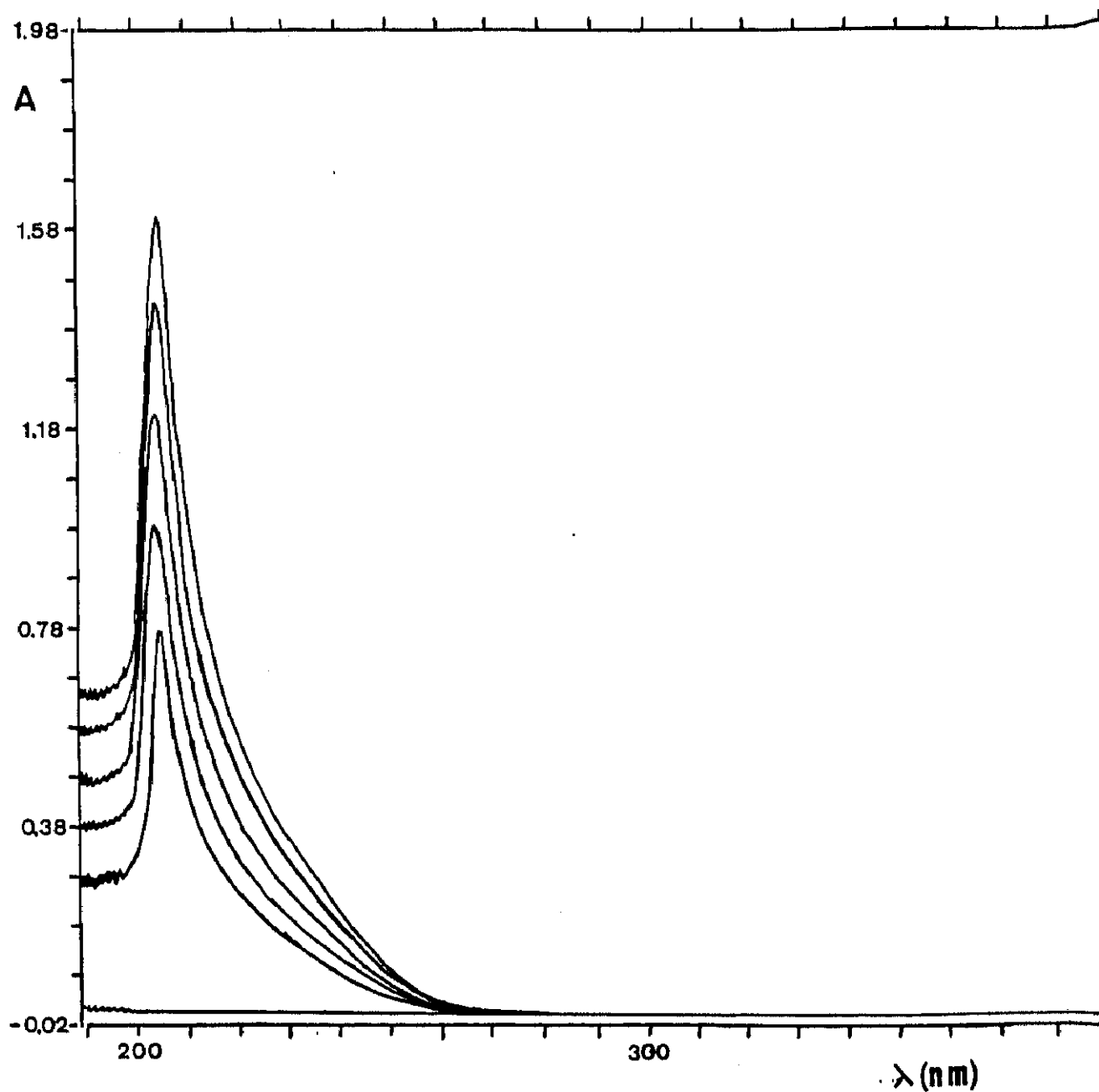


Fig.24 Espectros de absorción de la cisteína, disuelta en tampón fosfato 0.1M (pH=6.78), en función de la concentración. 1) $9.9 \cdot 10^{-4}$, 2) $1.38 \cdot 10^{-3}$, 3) $1.77 \cdot 10^{-3}$, 4) $2.15 \cdot 10^{-3}$ y 5) $2.53 \cdot 10^{-3}$ M.

- TRIS $5.0 \cdot 10^{-2} M$

La variación provocada por la adición de cloruro de zinc a una disolución de cisteína, preparada en este medio, se observa en la figura 22. En ella se puede comprobar como la adición de zinc produce un aumento de la absorbancia en la zona de longitudes de onda, 225-230 nm, correspondientes a los enlaces zinc-tiol, al tiempo que el máximo de absorbancia se desplaza hacia longitudes de onda mayores.

Cuando se representa la longitud de onda en el máximo de absorción y en la zona del enlace zinc-tiol, se obtiene las curvas representadas en la figura 23. En ellas se observa como la absorbancia en estas dos longitudes de onda va aumentando a medida que aumenta la cantidad de zinc añadida hasta que se estabiliza, posiblemente por la saturación de la cisteína presente en disolución.

A partir de los ensayos realizados se puede concluir que el zinc es capaz de reaccionar con la cisteína y que en esta interacción intervienen los grupos tiólicos ya que aparece la absorbancia característica de ellos en el espectro. Además parece ser que existe más de una especie química en disolución procedentes de la interacción entre ambos compuestos.

IV.C.2.D. ABSORCION EN FUNCION DE LA CONCENTRACION

La espectrofotometría de absorción molecular U.V. es un método analítico válido para comprobar la existencia de ciertas estructuras y, así, servir como método de identificación, pero también como método de determinación cuantitativa de diferentes compuestos. Cada grupo activo en el U.V., en unas condiciones específicas, contribuye a la absorbancia y presenta un coeficiente de absorción molar, ϵ , característico. Por lo tanto, la relación entre la absorbancia y la concentración, $A=f(c)$, es lineal si se cumple la ley de Lambert-Beer. En caso afirmativo,

la medida de la absorbancia nos permite determinar la concentración.

En este caso se estudió la relación entre la absorbancia que presenta la cisteína y la concentración de la misma, para comprobar si cumple la ley de Lambert-Beer y calcular su coeficiente de absorción molar en el máximo, tanto en tampón fosfato como en TRIS·HCl. Estos datos sirven para realizar, posteriormente, su comparación con el fragmento y los de las MT, moléculas que incluyen los grupos tiólicos como componente fundamental.

a) Medio fosfato

Se toma una disolución de cisteína disuelta en tampón fosfato 0.1M a pH 6.78 y se estudia la absorbancia en función de la concentración de cisteína que oscila entre 0.9 y $2.53 \cdot 10^{-4}$ M obteniendo los espectros que se muestran en la figura 24. En ella se comprueba que la absorbancia aumenta a medida que lo hace la concentración y se representa en la figura 25. En este intervalo de concentraciones se cumple la ley de Lambert-Beer:

$$A = \xi \cdot b \cdot c$$

siendo: A, la absorbancia

ξ , el coeficiente de extinción molar

b, la longitud del camino óptico

c, la concentración en moles·L⁻¹

como conocemos el valor de la longitud del camino óptico, b=1cm, a partir de la pendiente de la recta se puede calcular ξ . En las condiciones de este ensayo el valor de $\xi=5.66 \cdot 10^4$ L·mol⁻¹·cm⁻¹.

Absorbancia a 204 nm en función de la concentración de cisteína

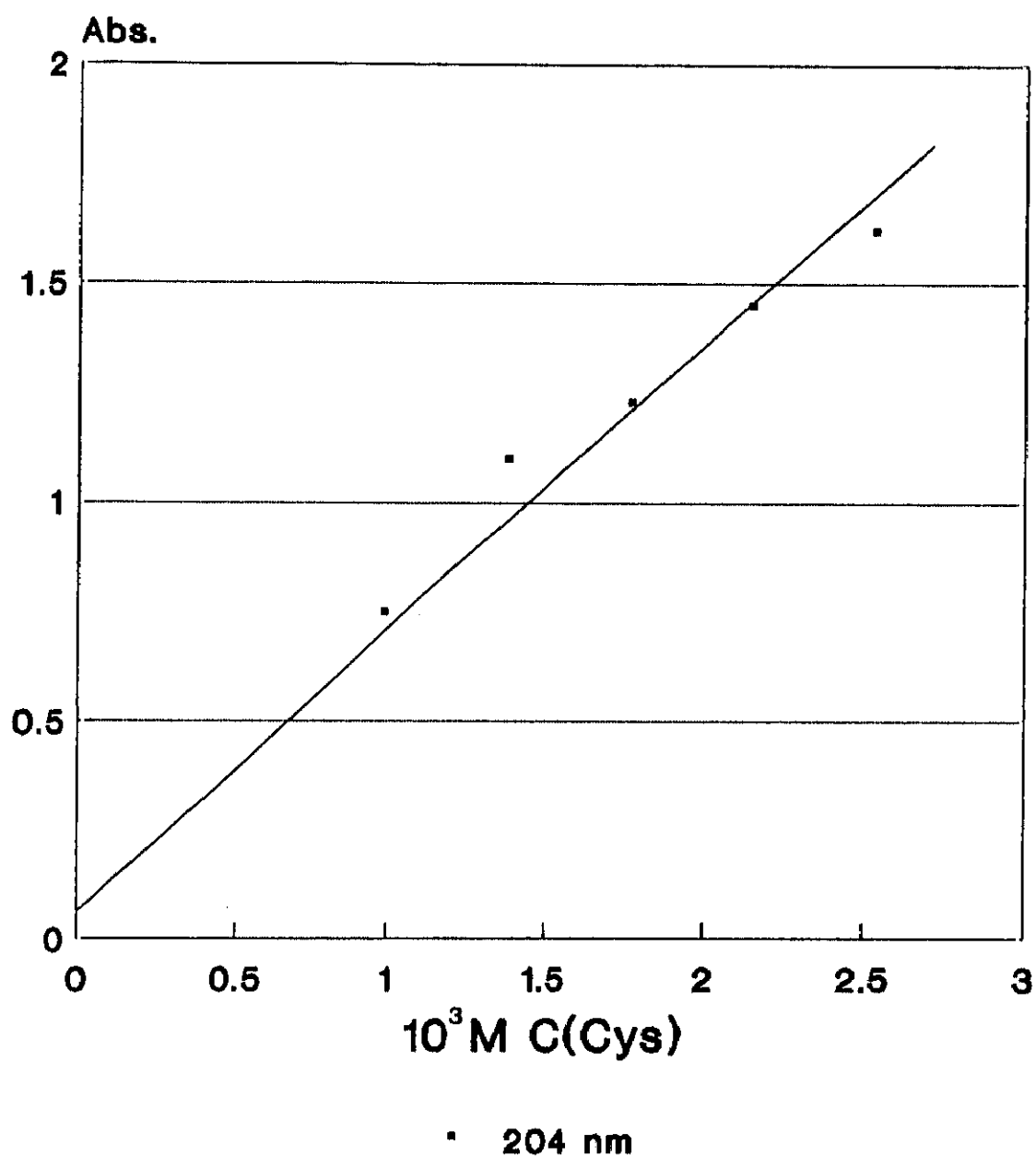


Fig.25 Absorbancias en función de la concentración de cisteína en tampón fosfato 0.1 M

b) Medio TRIS·HCl

Se preparan diferentes diluciones de cisteína en TRIS·HCl $2.5 \cdot 10^{-3}M$ a pH 7.5, en dos ensayos diferentes y sucesivos, uno para concentraciones que oscilaron entre 1.65 y $2.75 \cdot 10^{-4}M$ y, otro entre 4.13 y $8.11 \cdot 10^{-4}M$.

Se obtuvieron los espectros que se muestran en las figuras 26a y 26b. Como se realizó en medio fosfato, una vez comprobada la existencia de una relación entre la absorbancia y la concentración, se efectuó la representación $A=f(c)$, que se muestra en la figura 27, apartir de la cual se calculó el coeficiente de absorción molar.

En la tabla 19 se agrupan los valores de los coeficientes de absorción molar obtenidos en ambos medios. Para una misma longitud de onda, λ_{104} , los coeficientes de absorción molar son similares en los dos medios estudiados. El hecho de que en medio TRIS, el ξ es ligeramente menor que en medio fosfato, está en concordancia con lo expuesto anteriormente de la exaltación de la señal en el medio orgánico. Sin embargo, para longitudes de onda de 230 nm, en la zona correspondiente al hombro que solamente presenta la cisteína en medio TRIS, se indica un intervalo de valores puesto que esta parte del espectro esta peor definida y varia ligeramente en función del intervalo de concentraciones estudiado.

Tabla 19. Coeficientes de absorción molar de la cisteína en dos medios diferentes, TRIS y fosfato, a dos longitudes de onda.

M E D I O	ξ_{1104}	ξ_{2110}
FOSFATO	$5.66 \cdot 10^2$	----
TRIS·HCl	$7.76 \cdot 10^2$	$^13.17-4.15 \cdot 10^2$

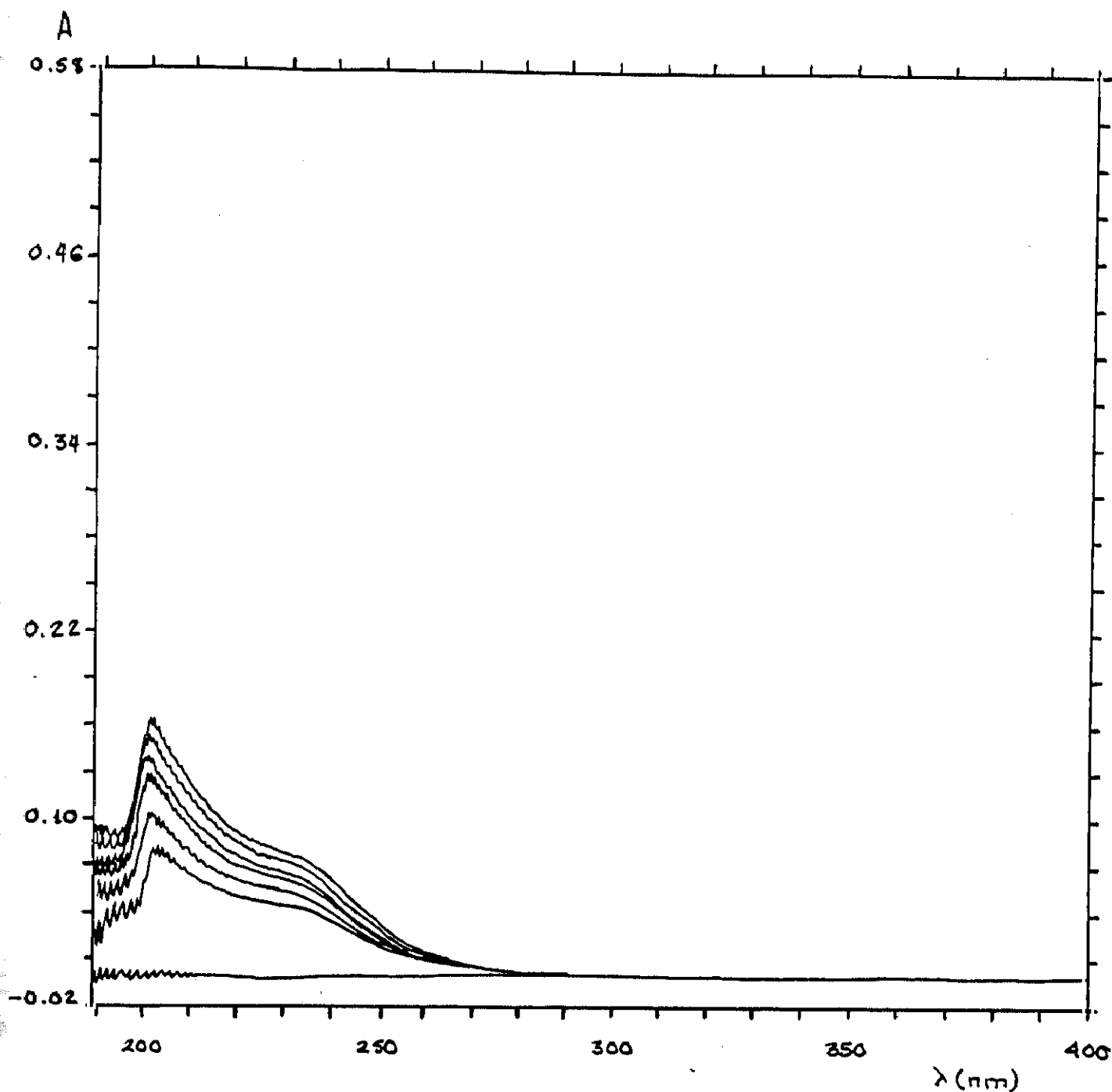


Fig.26a Espectros de Absorción molecular ultravioleta para la cisteína, disuelta en TRIS $2.5 \cdot 10^{-2}M$ (pH=7.5), en función de la concentración. 1) $0.84 \cdot 10^{-4}$, 2) $0.95 \cdot 10^{-4}$, 3) $1.07 \cdot 10^{-4}$, 4) $1.18 \cdot 10^{-4}$, 5) $1.28 \cdot 10^{-4}$, 6) $1.38 \cdot 10^{-4}$

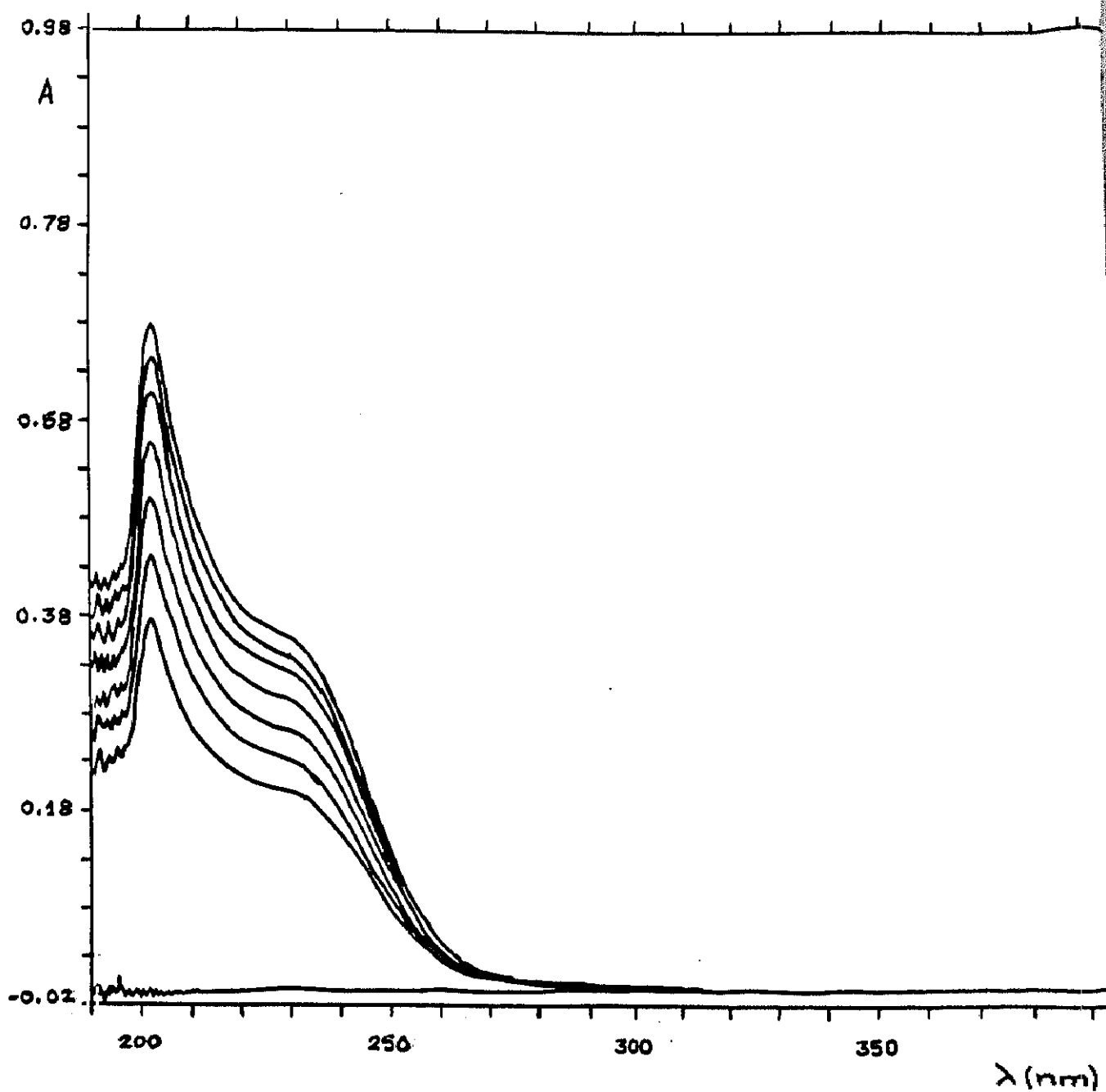


Fig.26b. Espectros de Absorción molecular ultravioleta para la cisteína, disuelta en TRIS $2.5 \cdot 10^{-2}M$ (pH=7.5), en función de la concentración. 1) $4.13 \cdot 10^{-4}$, 2) $4.88 \cdot 10^{-4}$, 3) $5.56 \cdot 10^{-4}$, 4) $6.23 \cdot 10^{-4}$, 5) $6.83 \cdot 10^{-4}$, 6) $7.51 \cdot 10^{-4}$, 7) $8.11 \cdot 10^{-4}$

Absorbancia a 204 y 230nm en función de la concentración de cisteína

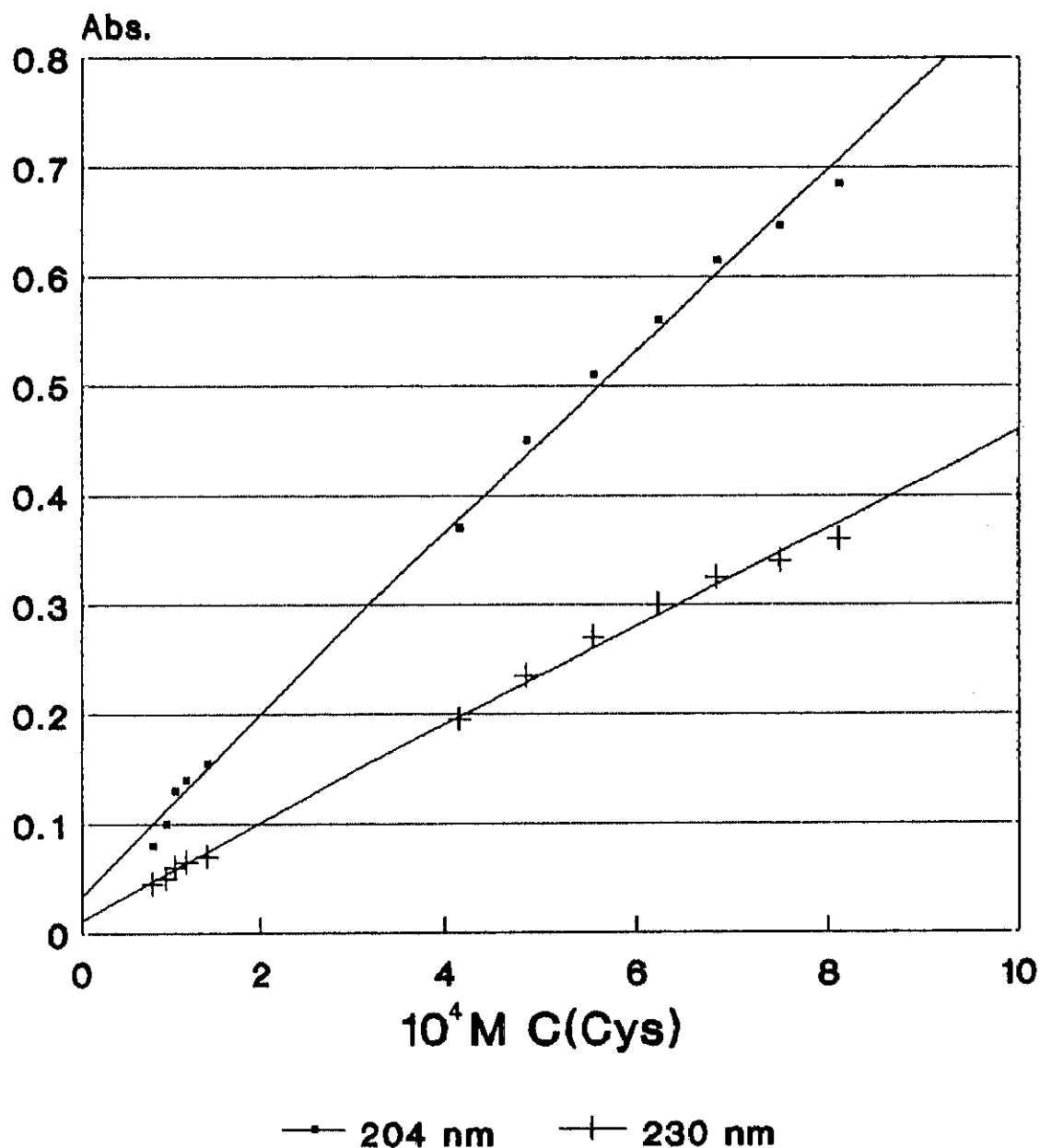
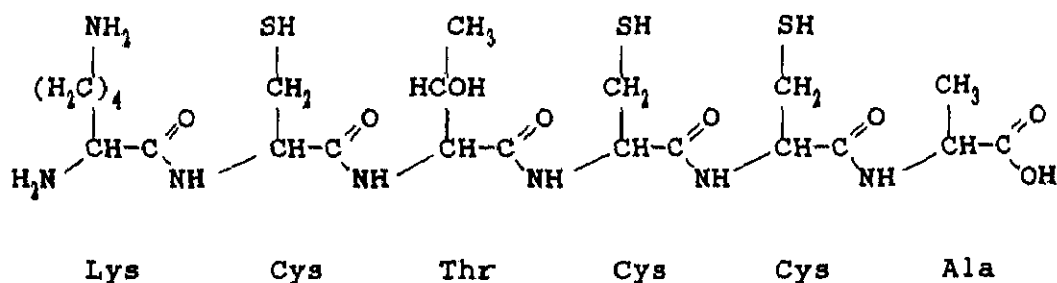


Fig. 27 Absorbancia en función de la concentración de cisteína, en TRIS $2.5 \cdot 10^{-2} \text{ M}$ (pH=7.5)

IV.C.3. FRAGMENTO 56-61 DE LA MT-I

El fragmento 56-61 de la MT-I procedente de hígado de ratón cuya fórmula es: $C_{21}H_{41}N_7O_8S_3$ presenta la siguiente secuencia de aminoácidos: Lys-Cys-Thr-Cys-Cys-Ala, que corresponde a la estructura desarrollada de:



Presenta, por lo tanto, numerosos grupos con propiedades ácido-base, dos grupos aminos, un hidroxilo, tres tiólicos, un carboxílico y cinco amidas, por lo que el pH de una disolución influye en su forma química. La presencia de tres grupos tiólicos hace que sea una sustancia que se oxida con facilidad formando enlaces disulfuros, principalmente intermoleculares.

El producto comercial contiene como agente estabilizante para evitar la oxidación el mercaptoetanol. No se ha procedido a la purificación del fragmento pero para los cálculos de concentración se ha tenido en cuenta el porcentaje de impurezas indicado en la etiqueta del producto comercializado.

Cabe señalarse que sobre este compuesto, el fragmento, no existen estudios realizados por espectrofotometría UV, al menos que nosotros conozcamos.

IV.C.3.A. INFLUENCIA DEL MEDIO

Como se realizó con la cisteína se ha comprobado en qué medida puede afectar la naturaleza y concentración del medio en

que se disuelve el fragmento en las propiedades de absorción del mismo. Los espectros obtenidos en el tampón fosfato y tampón TRIS a dos concentraciones son los que se muestran en la figura 28. En ellos se puede comprobar que la naturaleza del medio no interviene ya que el perfil no se modifica, es análogo en los tres casos y no se obtiene un hombro de absorción para longitudes de onda mayores a la λ del máximo, contrariamente a lo que ocurre para la cisteína.

Es probable que las interacciones de esta molécula, mucho más voluminosa con los compuestos disueltos sean menos significativos que para la cisteína, molécula de menor tamaño, por lo que el perfil del espectro no varía en función del medio empleado para preparar las disoluciones.

Sin embargo, la respuesta para la misma concentración de fragmento depende del medio, es menor en medio fosfato que en medio TRIS y para este último se obtiene una mayor señal para una menor concentración de electrolito en la disolución.

IV.C.3.B. INFLUENCIA DEL pH

El fragmento presenta numerosos grupos protonables que provocan la existencia de propiedades ácido-base en esta molécula. Por lo tanto, al igual que se hizo con la cisteína, se va a realizar un estudio espectrofotométrico de la influencia del pH sobre esta molécula y sus efectos sobre el espectro U.V.

a) Medio TRIS $5.0 \cdot 10^{-1}M$ en atmósfera de oxígeno

Se parte de una disolución de fragmento en TRIS $5.0 \cdot 10^{-1}M$ en un intervalo de pH que varían entre 4.5 y 9.5. Los espectros obtenidos se muestran en la figura 29. En él se ve como el perfil varía notablemente en función del pH. A pH ácidos presenta un máximo a unos 200nm que va desplazandose, a medida que se eleva

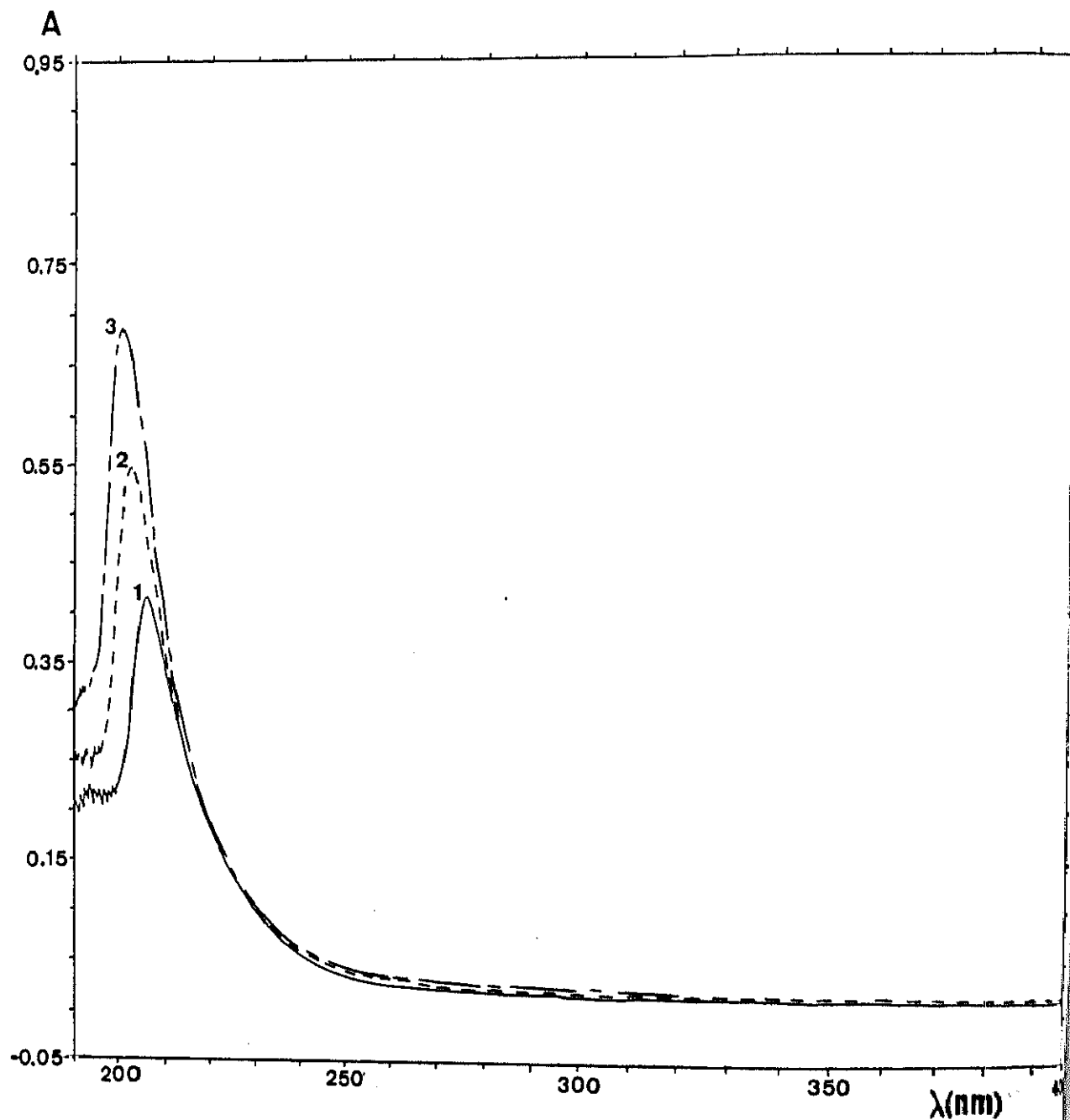


Fig.28 Variación del perfil de absorción molecular del fragmento terminal 56-61 de la MT-I en función del medio en que se encuentre disuelto: 1) tampón TRIS HCl $5.0 \cdot 10^{-2}M$ (pH=7.5), 2) tampón TRIS HCl $2.5 \cdot 10^{-2}M$ (pH=7.5) y 3) tampón fosfato $4 \cdot 10^{-3}M$ (pH=7.4)

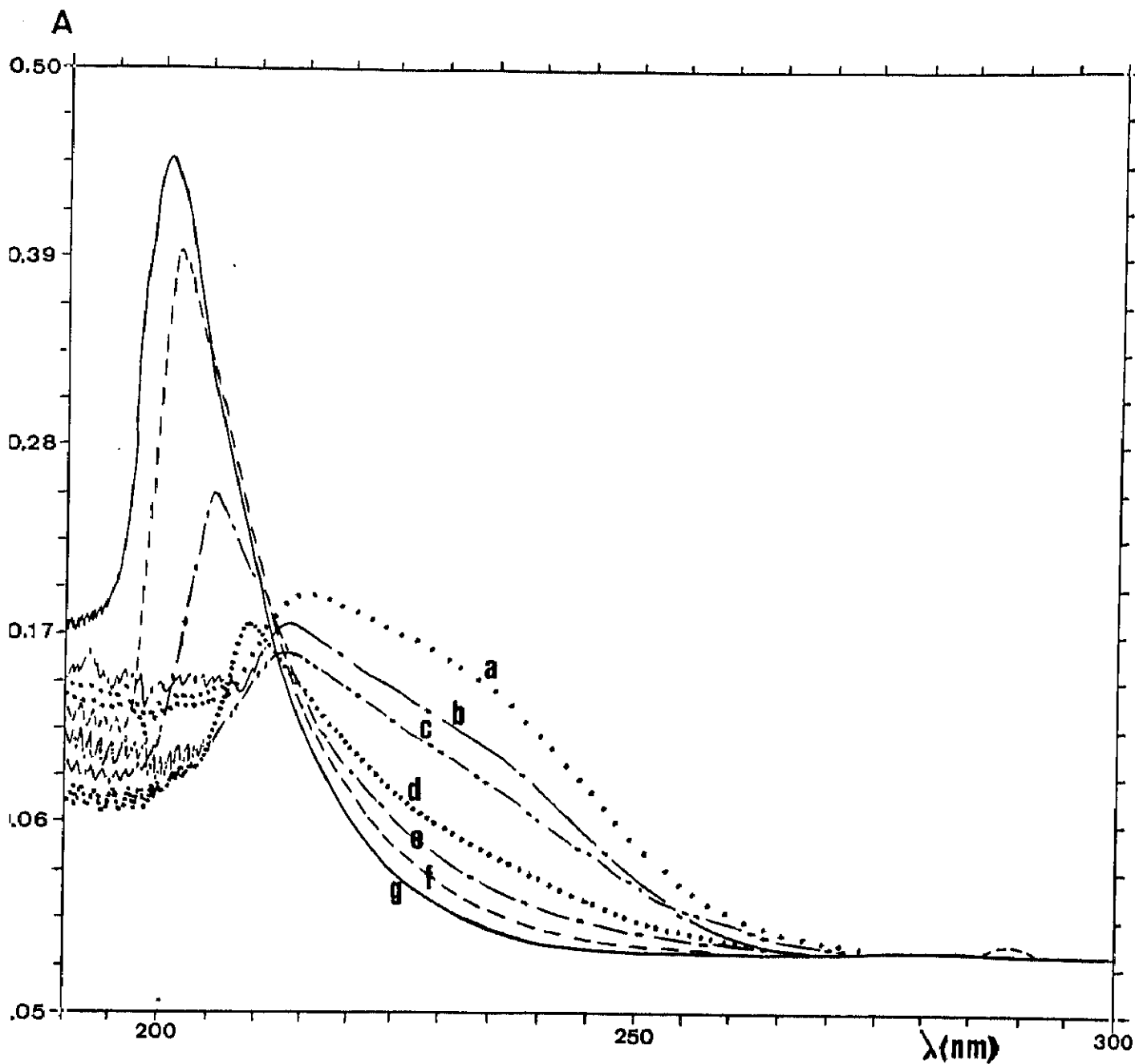


Fig. 29 Variación del espectro ultravioleta de una disolución de fragmento ($2.32 \cdot 10^{-5}\text{M}$) en función del pH de la disolución de TRIS $5.0 \cdot 10^{-2}\text{M}$: (•••••) pH=9.5, (—•—) pH=9.0, (—•—) pH=8.5, (•••••) pH=8.0, (—•—) pH=7.5, (—•—) pH=7.0, (——) pH=4.5

el pH, hacia longitudes de onda mayores a la vez que va disminuyendo la señal de absorbancia (fig. 29a, b,c). A partir de pH básicos, el perfil se modifica considerablemente, es una onda que presenta un hombro amplio y un pico, no bien definido a 215 nm, que aumentan con el pH.

Se representó la absorbancia, a diferentes longitudes de onda, en función del pH del medio y se obtuvieron los valores de la gráfica 30. A partir de ella se puede observar la existencia de dos especies químicas, una protonada que corresponde a los espectros con un máximo de absorción a 201nm y la no protonada cuyo máximo se encuentra a 213nm. Este desplazamiento batocrómico se debe a la ionización de un grupo, la desprotonación del grupo tiol. El valor de pK_a aproximado que se puede observar es superior a 8.

b) Medio TRIS $2.5 \cdot 10^{-3}M$ en atmósfera inerte

En este caso, se realizó un estudio de la variación del perfil espectrofotométrico UV de una disolución de fragmento en TRIS en función del pH, en el intervalo que va de 1.5 a 12.0. Algunos de los resultados obtenidos se muestran en la figura 31. Como se puede comprobar, el comportamiento es análogo al anterior, pero se observa con mayor claridad por dos motivos. El primero es que el experimento se realizó en atmósfera inerte y por lo tanto la señal presenta menos oscilaciones y, en segundo, porque la concentración de TRIS en la disolución es la mitad lo que exalta la señal. A pH ácidos presenta un perfil con un pico perfectamente definido a 200 nm que disminuye a medida que aumenta el pH, para pH básicos este pico está desplazado hasta 210 nm, además, el espectro presenta un hombro a 230 nm que va aumentando a medida que lo hace el pH.

Al representar la absorbancia en función del pH, para diferentes longitudes de onda (fig. 32) se observa la existencia de dos especies químicas diferentes, una protonada para pH=2-7,

Absorbancia a 205, 215 y 230 nm en función del pH

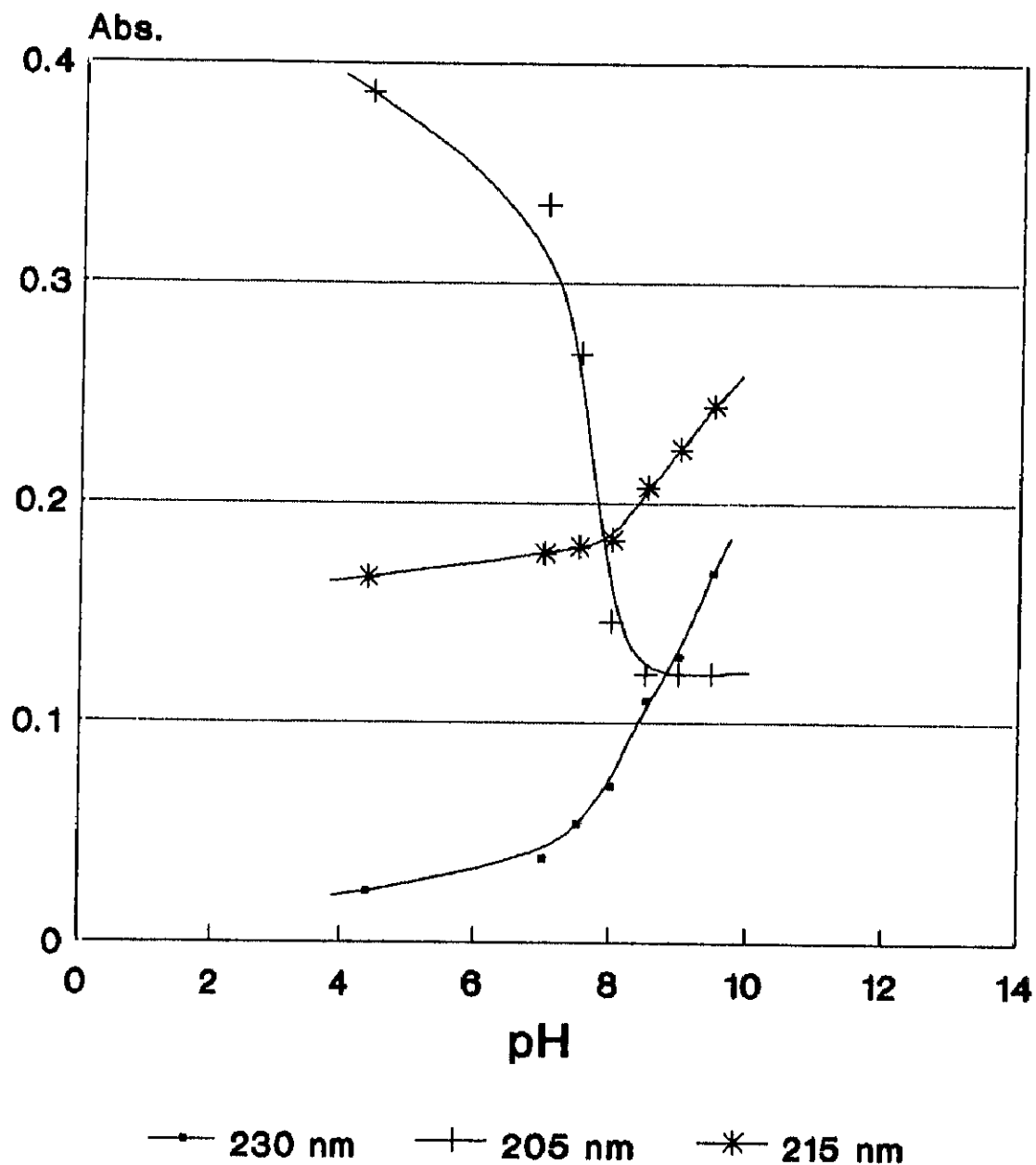


Fig.30 Absorbancia de una disolución $2.32 \cdot 10^{-5}M$ de fragmento terminal 58-61 en TRIS $5.0 \cdot 10^{-2}M$ en función del pH

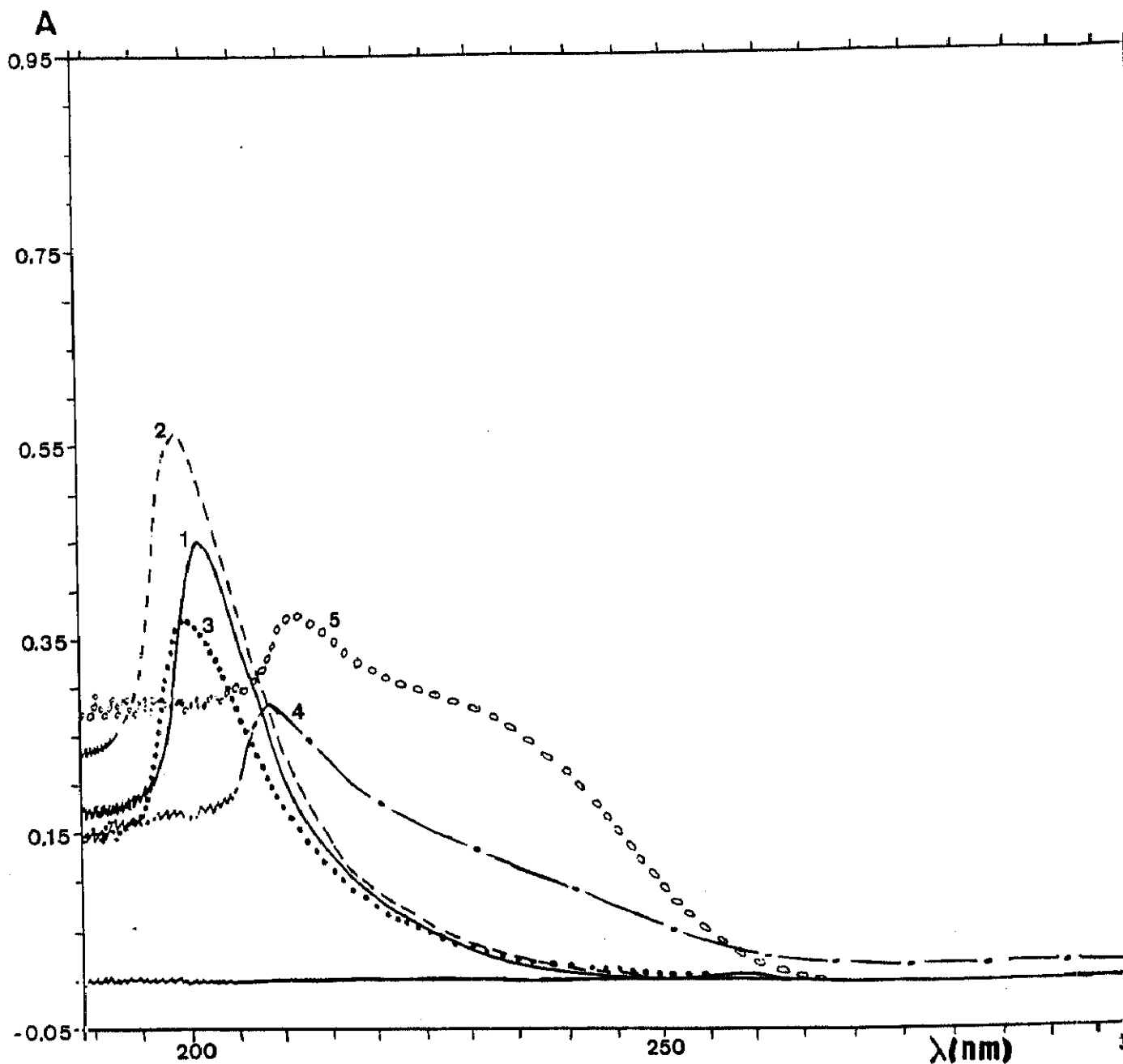


Fig.31 Variación del espectro ultravioleta de una disolución, $8.82 \cdot 10^{-5}\text{M}$, de fragmento terminal 56-61 en TRIS HCl $2.5 \cdot 10^{-2}\text{M}$ a varios pH diferentes: (—) pH=1.5, (---) pH=3.7, (.....) pH=7.0, (— · —) pH=8.5 y (ooooo) pH 11.6

Absorbancia a 220, 240 y 250 nm en función del pH

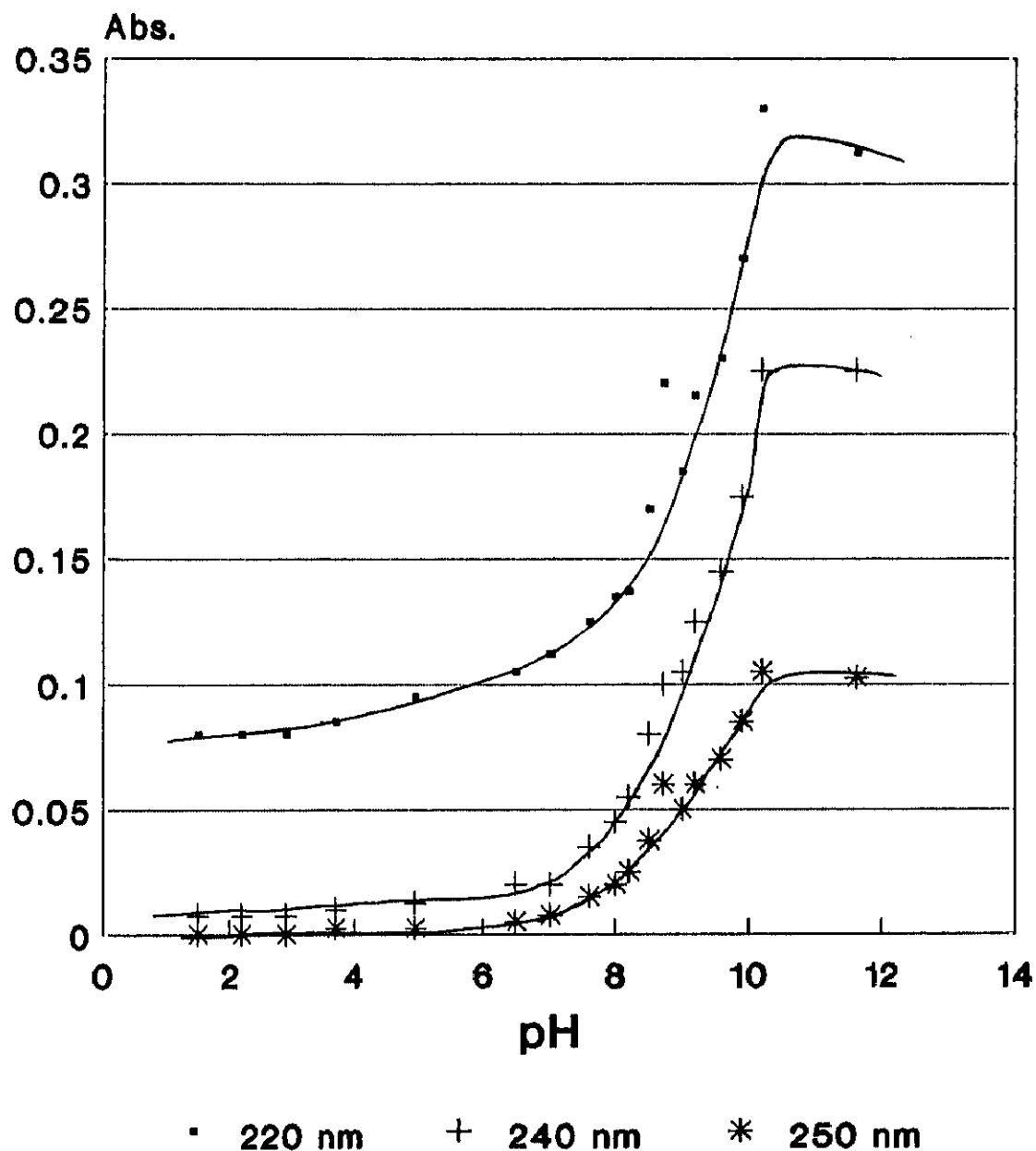


Fig.32 Absorbancia en función del pH para una disolución de fragmento, $8.82 \cdot 10^{-6} \text{M}$

cuyo máximo se encuentra situado a 200 nm y, otra desprotonada, con un máximo a 210 nm y un hombro a 230 nm, para $\text{pH}=9.0-11.5$. El valor aproximado del $\text{pK}_a > 8.5$.

c) Medio fosfato $5.0 \cdot 10^{-3} \text{M}$ en atmósfera inerte

Se efectuó un estudio en función del pH, en el intervalo que oscila entre 1.95 y 11.8, de una disolución de fragmento, $3.53 \cdot 10^{-4} \text{M}$, preparada en tampón fosfato. El comportamiento observado es análogo al anterior, se produce una modificación del perfil espectrofotométrico UV, a pH ácidos presenta un máximo de absorción a 198 nm, mientras que a pH básicos el máximo se sitúa próximo a 210 nm y presenta un hombro de absorción a 235 nm. Alguno de los espectros se muestran superpuestos en la figura 33.

Al representar la absorción en función del pH se obtienen las gráficas de la figura 34, en ellas se observan, al igual que en los casos anteriores, dos especies químicas diferentes. El valor aparente del pK_a es superior a 9.5.

d) Comparación entre medios

Se puede comprobar que el máximo de absorción está más desplazado hacia longitudes de onda menores a medida que disminuye la concentración del medio y, en función de la naturaleza del mismo, cuanto más compleja es la molécula que forma parte del disolvente mayor es la longitud de onda a que aparece el máximo y mejor definidos están los espectros. Además, también en función de la naturaleza y concentración del medio, siguiendo este orden citado, aumenta la constante de acidez del compuesto estudiado, el fragmento 56-61 de la MT-I. Por otro lado, en atmósfera inerte se disminuyen las oscilaciones en la zona de menores longitudes de onda. Sin embargo, los espectros realizados en atmósfera de oxígeno son comparables.

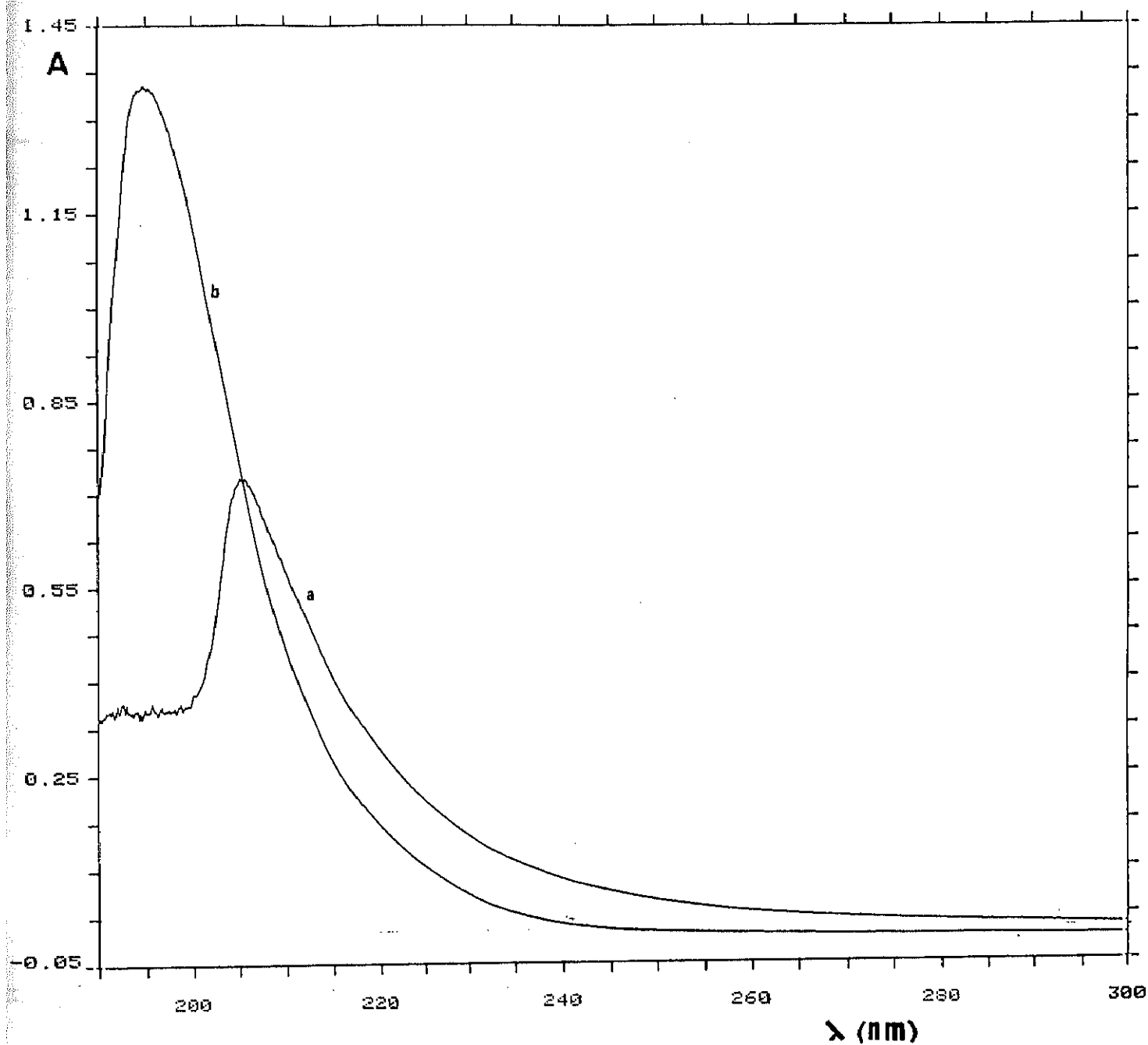


Fig. 33a. Espectros de absorción U.V. de una disolución de fragmento $5.07 \cdot 10^{-5}$ M en medio fosfato a diferentes pH: a) 8.9 y b) 4.3

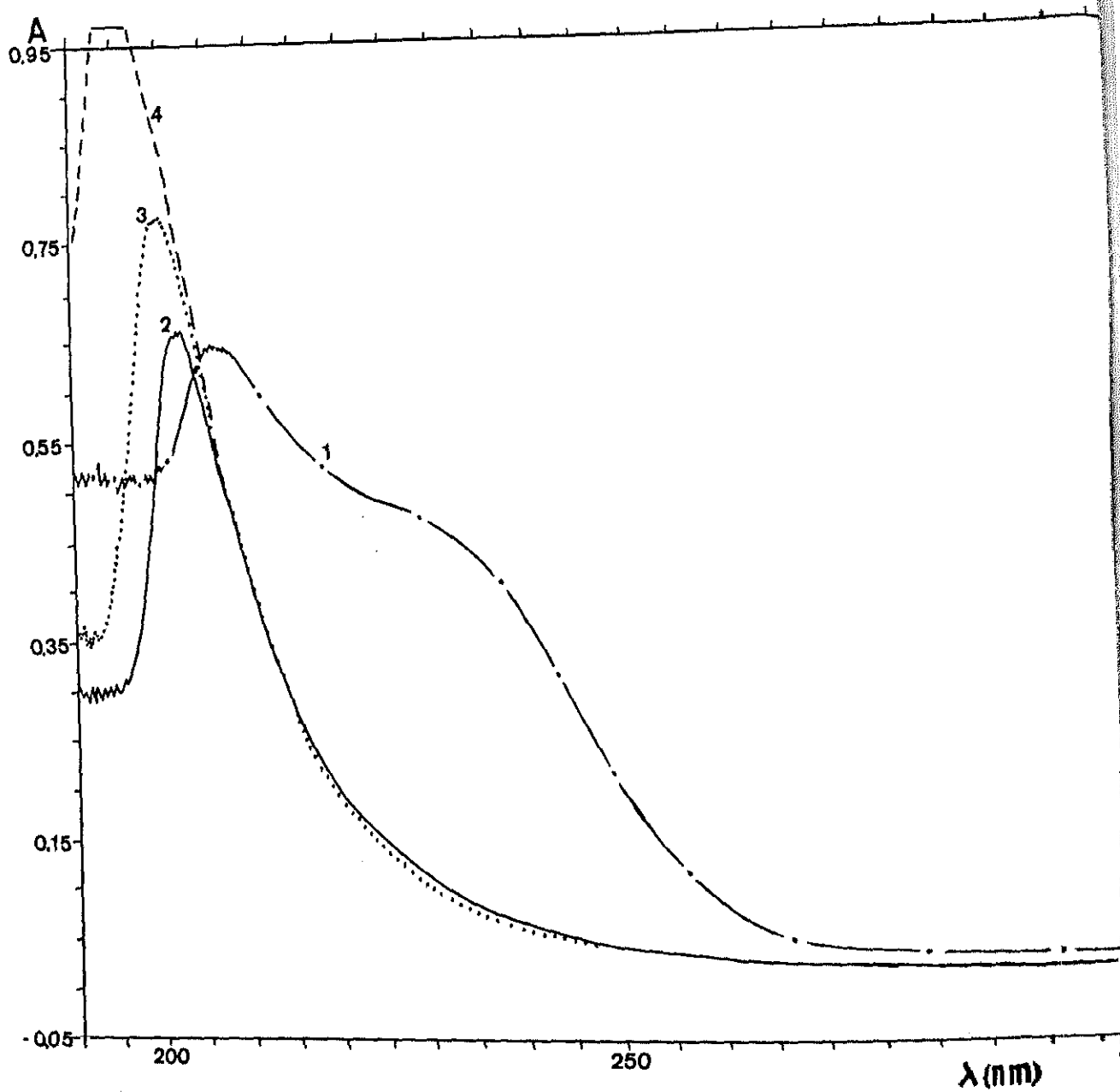


Fig. 33a. Espectros de absorción U.V. de una disolución de fragmento $3.88 \cdot 10^{-5}$ M en medio fosfato a diferentes pH: 1) 11, 2) 8, 3) 7 y 4) 6

Absorbancia a 220, 240 y 250 nm en función del pH del F

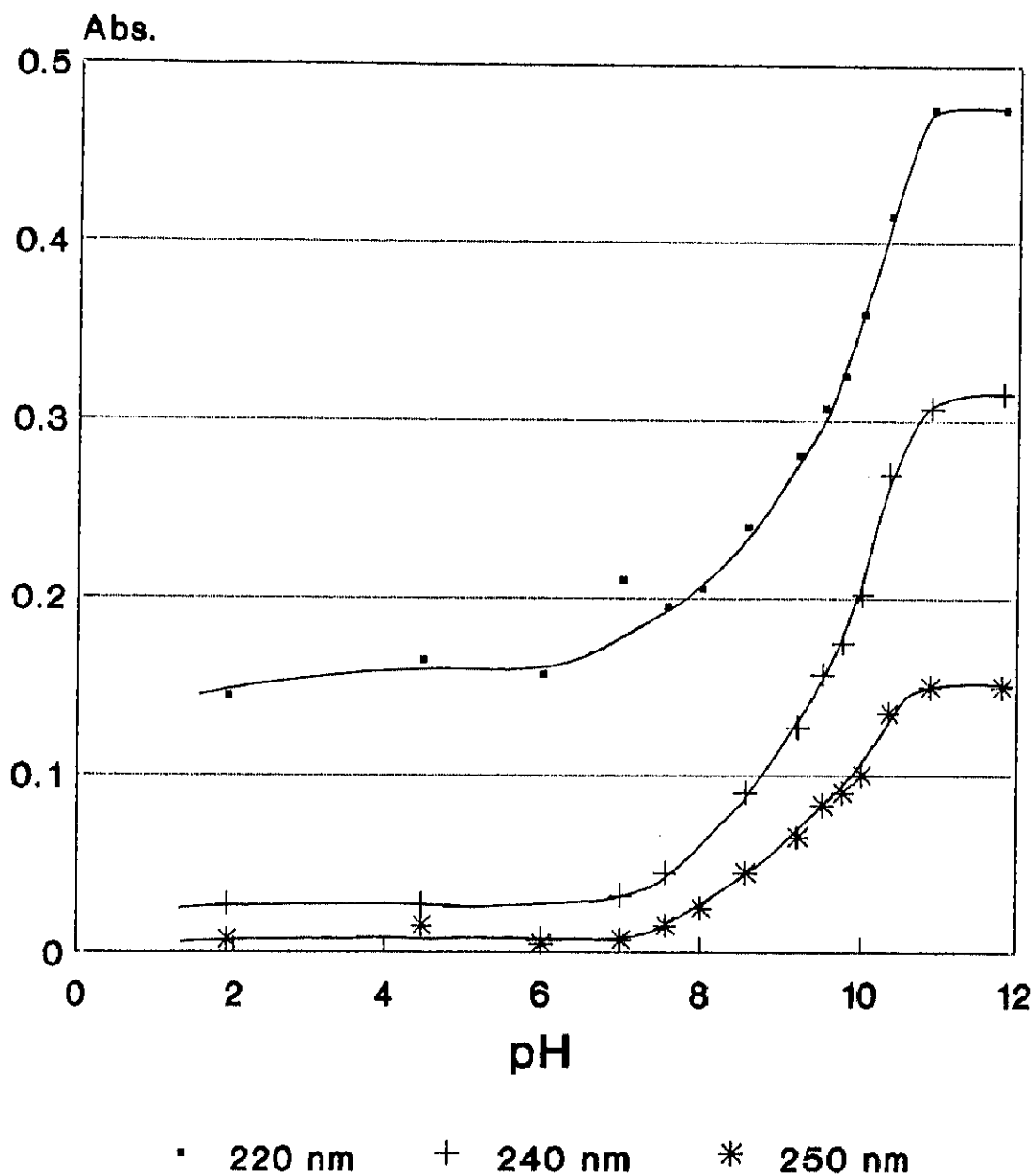


Fig. 34. Representación de la absorbancia a tres longitudes de onda diferentes, 220, 240 y 250 nm en función del pH para una disolución de fragmento en fosfato.

La interpretación de estos resultados se ha realizado, así mismo, utilizando un programa de cálculo con ordenador en la Universidad Autónoma de Barcelona (Departamento de Química Analítica).

Los valores obtenidos para las constantes aparentes de disociación del equilibrio ácido-base: $HL \rightleftharpoons H^+ + L^-$ en los diferentes medios, en atmósfera inerte, se indican a continuación:

M E D I O	pK_a
TRIS($\lambda=240nm$)	8.92
TRIS($\lambda=220nm$)	8.87
Fosfato($\lambda=250nm$)	9.07
Fosfato($\lambda=240nm$)	9.40
Fosfato($\lambda=220nm$)	9.49

Como ya se ha indicado, los pK_a para el fragmento son ligeramente mayores en medio fosfato que en medio TRIS. Sin embargo, cabe señalar que todos los valores son próximos y en buen acuerdo con los determinados, por diferentes métodos, para otros compuestos de características similares y que se encuentran en diversas publicaciones. En este caso, la disociación corresponde a los protones ligados a los grupos tioles.

IV.C.3.C. ADICION DE CATIONES

El fragmento, cuya estructura se ha ido indicado, presenta tres grupos tiólicos y dos aminos y, por lo tanto, presenta capacidad para complejar cationes metálicos. Para comprobar esta capacidad se han realizado varios ensayos de adiciones de cationes, cadmio y/o zinc, a una disolución de fragmento.

Como ya se ha comprobado, el fragmento presenta un espectro U.V. específico a cada pH.

a) Adiciones de cadmio

Se realiza una adición de CdCl_2 a una disolución de fragmento y se produce una modificación del perfil espectrofotométrico UV (fig. 35). El máximo de absorción que se encontraba a unos 200 nm se desplaza hasta los 210 nm, con una disminución de la señal, junto con la aparición de un hombro a unos 240 nm, que es característica de los enlaces Cd-S que se han formado entre el cadmio añadido y los grupos tiólicos existentes en el fragmento. El desplazamiento que sufre el primer pico se debe a que la especie química existente, una vez formado el complejo cadmio-fragmento, es diferente. Se produce una disminución de la señal en la zona del máximo de absorción ya que el número de grupos tiólicos libres ha disminuido.

Se han realizado varios estudios en presencia y ausencia de oxígeno. Los espectros obtenidos, como ya se ha indicado anteriormente, son relativamente análogos, la influencia del oxígeno se ejerce sobre las vibraciones electrónicas a longitudes de onda cercanas a 190 nm, pero como el objetivo es el estudio del hombro, atribuido a los enlaces metal-tiolato, la presencia del oxígeno no tiene importancia.

b) Adiciones de CdCl_2 a una disolución de fragmento, en TRIS y presencia de oxígeno

Se han realizado varios ensayos, no sistemáticos, de las adiciones de cadmio. Ya hemos visto que el fragmento es capaz de complejar los cationes cadmio presentes en la disolución, fenómeno que se traduce en la aparición de un hombro de absorción a unos 240 nm y, que corresponde, a los enlaces Cd-S.

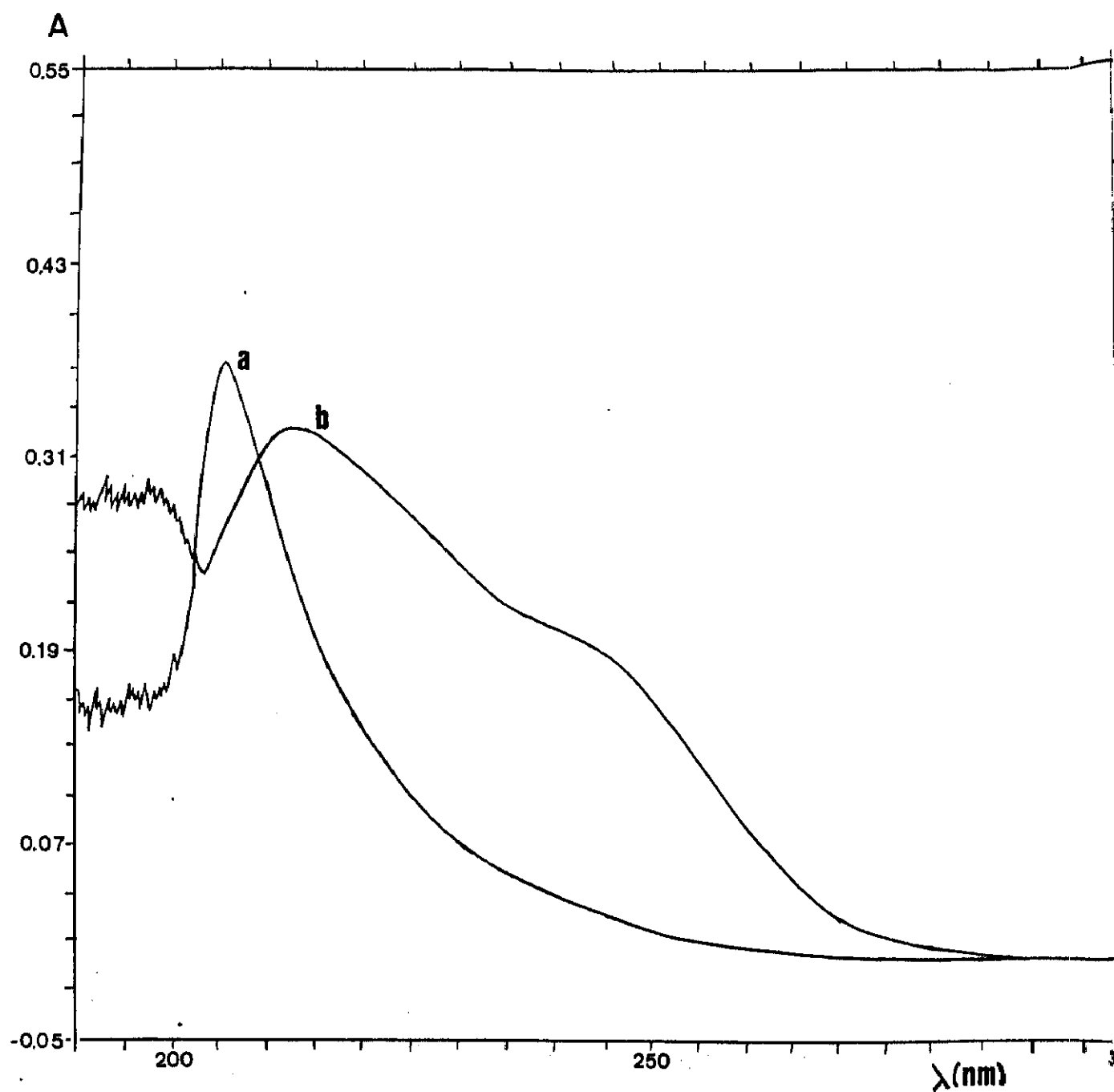


Fig.35 Evolución del espectro ultravioleta de: a) una disolución de fragmento, $2.57 \cdot 10^{-5}M$ y b) la misma disolución tras la adición de $1.24 \cdot 10^{-5}M$ de $CdCl_2$, ambas en TRIS HCl $5.0 \cdot 10^{-2}M$ (pH=7.5)

Las adiciones de cadmio realizadas a varias disoluciones de fragmento se muestran en la figura 36, cuando el medio utilizado era TRIS $2.5 \cdot 10^{-2} M$ y en las figuras 37 y 38 para TRIS $5.0 \cdot 10^{-2} M$. El comportamiento en ambos casos es análogo, se puede observar como tras la primera adición de cadmio aparece un hombro de absorción a 240-245 nm que se debe a los enlaces cadmio-tiól formados, posteriores adiciones de este catión provocan que esta absorción vaya aumentando, a partir de una concentración determinada de cadmio este hombro de absorción se desplaza hasta 250-255 nm (fig. 36-7 y 38-5). Posteriormente la onda se estabiliza aunque las adiciones de cadmio continúen (fig. 36-8). Por otra parte debe señalarse que existe una diferencia en función de la concentración del medio. Para concentraciones elevadas de TRIS (fig. 36), las adiciones de cadmio provocan un desplazamiento del pico máximo de absorción.

Cuando se representa la absorbancia a la longitud de onda debida al complejo Cd-S en función de la relación de concentraciones cadmio/fragmento, se observa como ésta va aumentando paulatinamente a partir de la primera adición de cadmio hasta que la relación se hace superior a 0.5, momento en que la pendiente disminuye (Fig. 39).

Esta evolución del espectro en la zona de longitudes de onda próximas a 250 nm puede atribuirse, a la formación de los enlaces cadmio-tiolato, como se puede observar al existir tres tipos de perfiles se deduce que existen más de dos especies químicas diferentes, el fragmento y, probablemente, el complejo cadmio-tiolato con diferentes estequiometrias. Posteriormente se produce la saturación del fragmento.

c) Adiciones de $CdCl_2$ a una disolución de fragmento preparada en TRIS y en atmósfera inerte

Con objeto de conocer la estequiometría del complejo cadmio-fragmento formado, se realizó un estudio sistemático de las

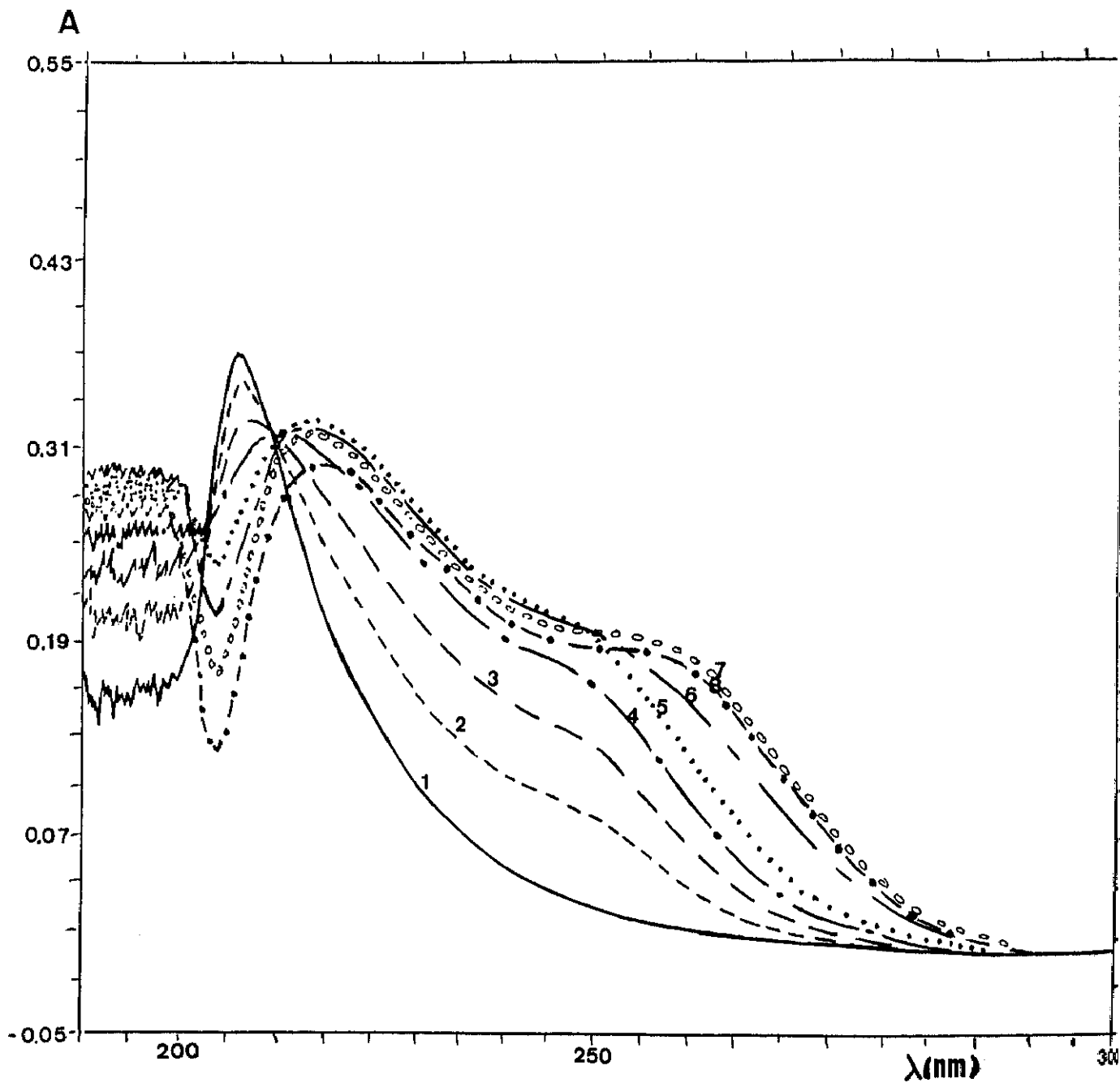


Fig.36 Evolución del espectro ultravioleta de una disolución de fragmento $2.65 \times 10^{-5} \text{ M}$ en función de las adiciones de CdCl_2 : (2) 2.78×10^{-8} , (3) 4.99×10^{-8} , (4) 7.85×10^{-8} , (5) 10.2×10^{-8} , (6) 12.4×10^{-8} , (7) 14.4×10^{-8} y (8) 16.4×10^{-8}

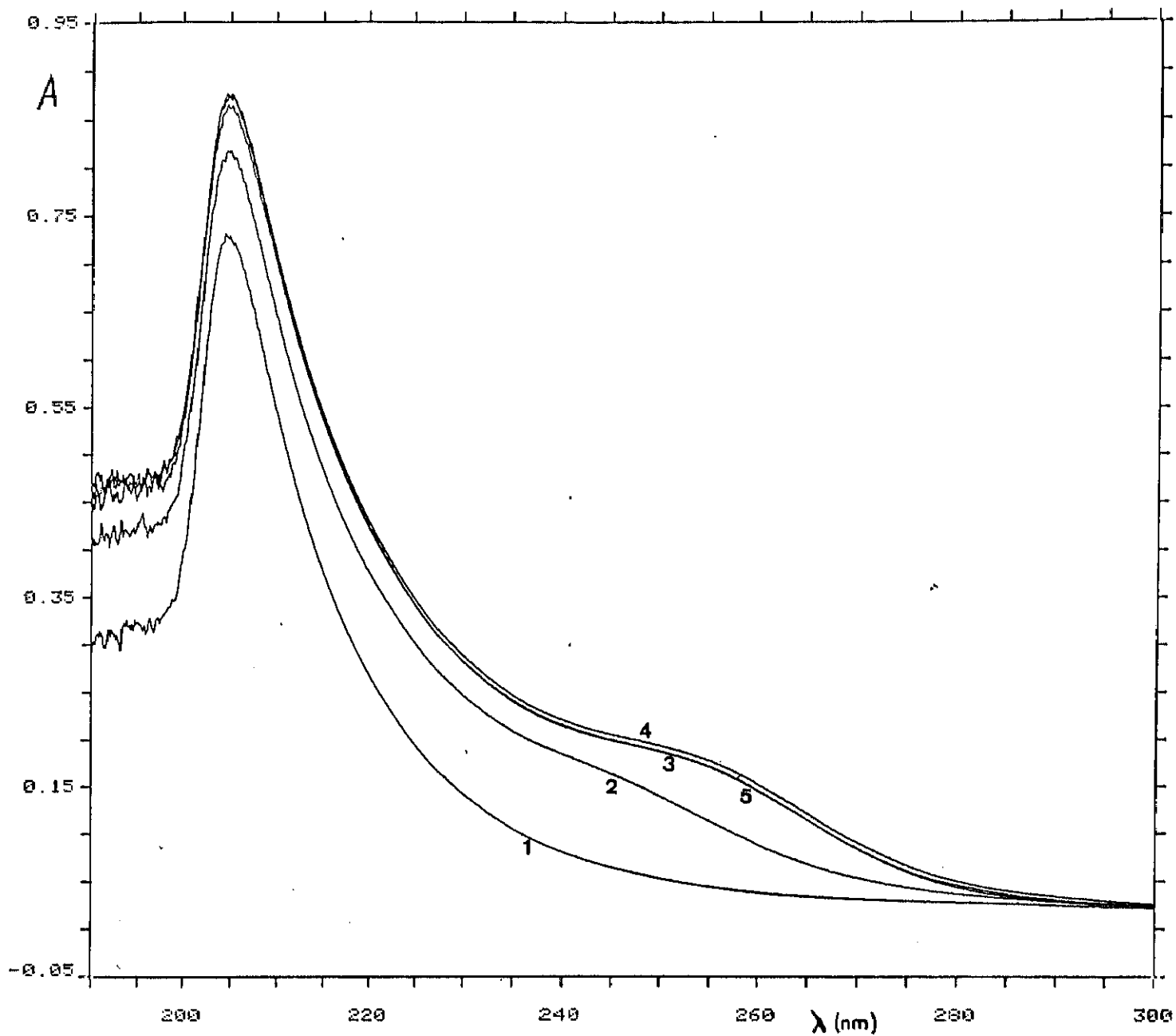


Fig.37a Variación del perfil de absorbancia ultravioleta de una disolución de fragmento, $3.06 \cdot 10^{-5} \text{M}$, tras las adiciones sucesivas de CdCl_2 : 1) 0 M , 2) $0.679 \cdot 10^{-5}$ 3) $2.33 \cdot 10^{-5} \text{M}$, 4) $3.3 \cdot 10^{-5} \text{M}$ y 5) $4.85 \cdot 10^{-5} \text{M}$

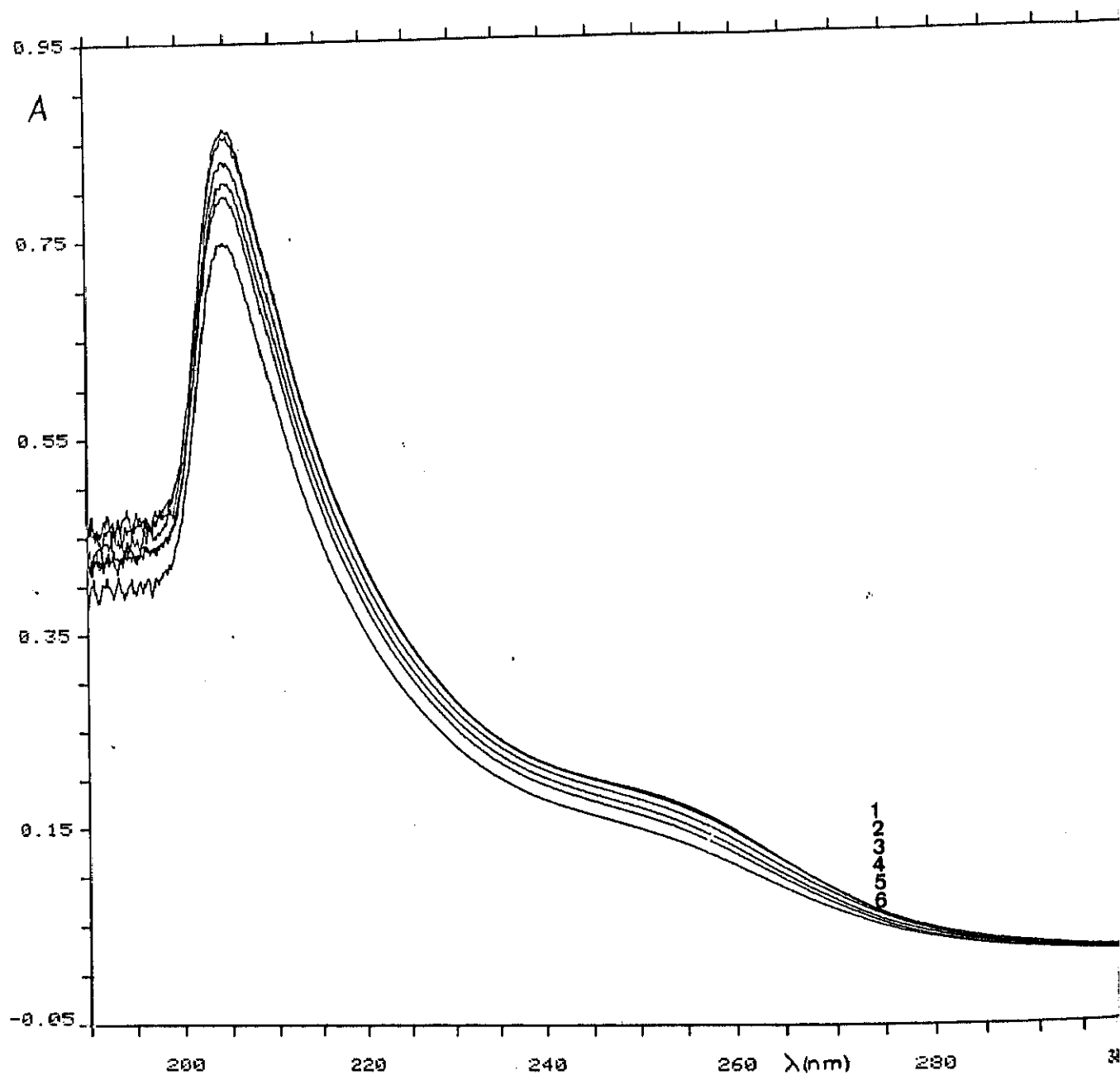


Fig.37b Variación del perfil de absorbancia ultravioleta de una disolución de fragmento, $3.06 \cdot 10^{-5}M$, tras las adiciones sucesivas de $CdCl_2$: 1) $4.85 \cdot 10^{-5}$, 2) $6.36 \cdot 10^{-5}$, 3) $9.21 \cdot 10^{-5}M$, 4) $11.9 \cdot 10^{-5}M$, 5) $14.4 \cdot 10^{-5}M$ y 6) $20.9 \cdot 10^{-5}M$

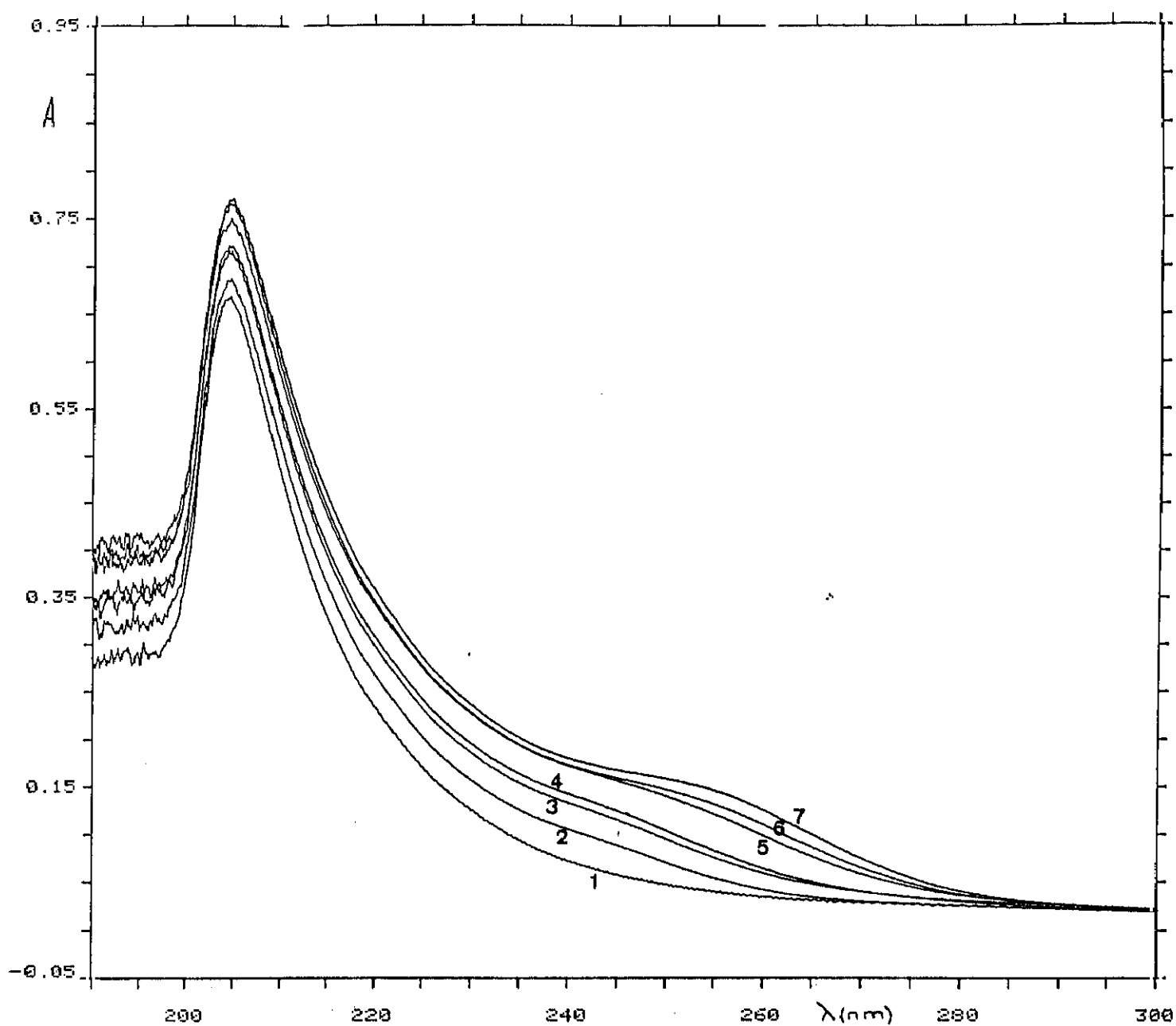


Fig.38 Variación del perfil de absorbancia ultravioleta de una disolución de fragmento, $2.65 \cdot 10^{-5}M$, tras las adiciones sucesivas de $CdCl_2$: 1) 0 M, 2) $2.96 \cdot 10^{-6}$ 3) $5.89 \cdot 10^{-6}M$, 4) $8.82 \cdot 10^{-6}M$, 5) $1.17 \cdot 10^{-5}M$, 6) $1.46 \cdot 10^{-5}M$ y 7) $2.87 \cdot 10^{-5}M$

adiciones de CdCl_2 a una disolución de fragmento. El método seleccionado para este estudio fue el de las "variaciones continuas". El método consiste en hacer variar la relación molar de ión metálico y de ligando entre 0 y 1, siendo la concentración final constante, $C = C_L + C_M$ y medir, posteriormente, la absorbancia en función de la fracción molar, X_L , de ligando (b,c). Si solamente se forma una única especie de complejo, de composición M_nL_m y se mide la absorbancia a una longitud de onda donde no absorban ni el metal ni el ligando libres, sino solamente el complejo, entonces se puede calcular el valor de n a partir del valor de la abscisa que corresponde al máximo de la curva, X_{max} .

$$\frac{n}{m} = \frac{X_{\text{max}}}{1 - X_{\text{max}}}$$

Aunque el número de puntos es limitado para la aplicación correcta de este método, en nuestro caso hemos preparado quince disoluciones de fragmento en presencia de CdCl_2 en TRIS $2.5 \cdot 10^{-3} \text{M}$, cuya concentración total era de $1.73 \cdot 10^{-3} \text{M}$, este método nos puede dar indicaciones sobre la posibilidad de complejación Cd-F , que no se conoce. La absorción se midió en cada caso a una longitud de onda de 250 nm, que es la que corresponde a los complejos Cd-S . En la figura 40 se representa la absorbancia a $\lambda = 250 \text{ nm}$ frente a la fracción molar de cadmio, de la forma de la curva parece probable la existencia de dos complejos de estequiometría diferente lo que está en acuerdo con los resultados comentados con respecto a la evolución de los espectros del apartado anterior. El máximo valor de absorbancia se obtiene para una fracción molar de cadmio igual a 0.4 que correspondería a un complejo Cd_2F_3 , si éste fuese único, sin embargo hemos dicho que es probable que haya dos complejos.

Para la determinación de la estequiometría del complejo cadmio-fragmento de manera concluyente habría que realizar una experimentación con otras adiciones. Sin embargo, aunque lo

Absorbancia a 250 nm en función del Cadmio añadido al fragmento

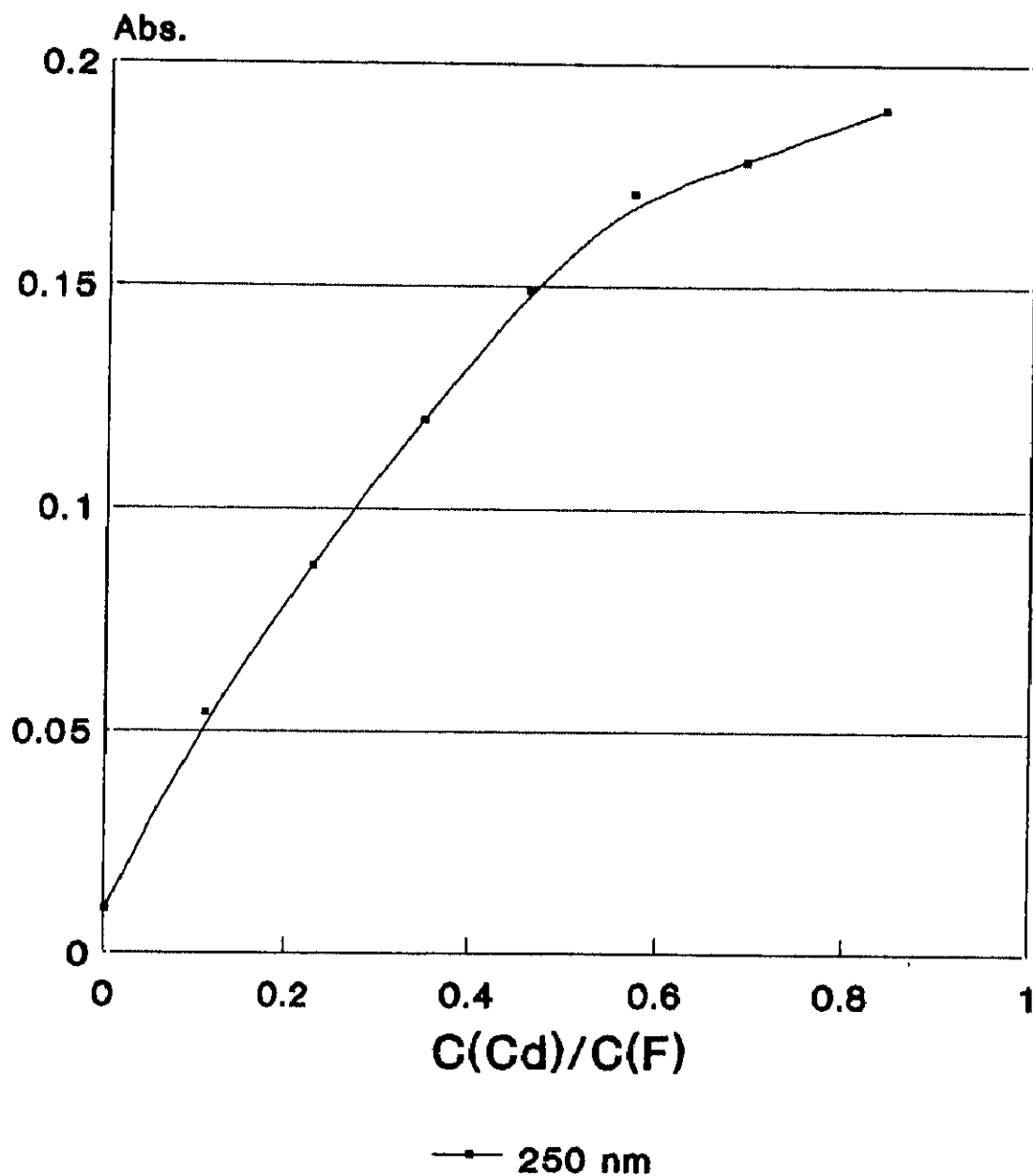


Fig.39 Absorbancia a 250 nm en función de la relación molar de concentraciones Cadmio/fragmento.

Absorbancia a 250 nm en función del Cadmio añadido al fragmento

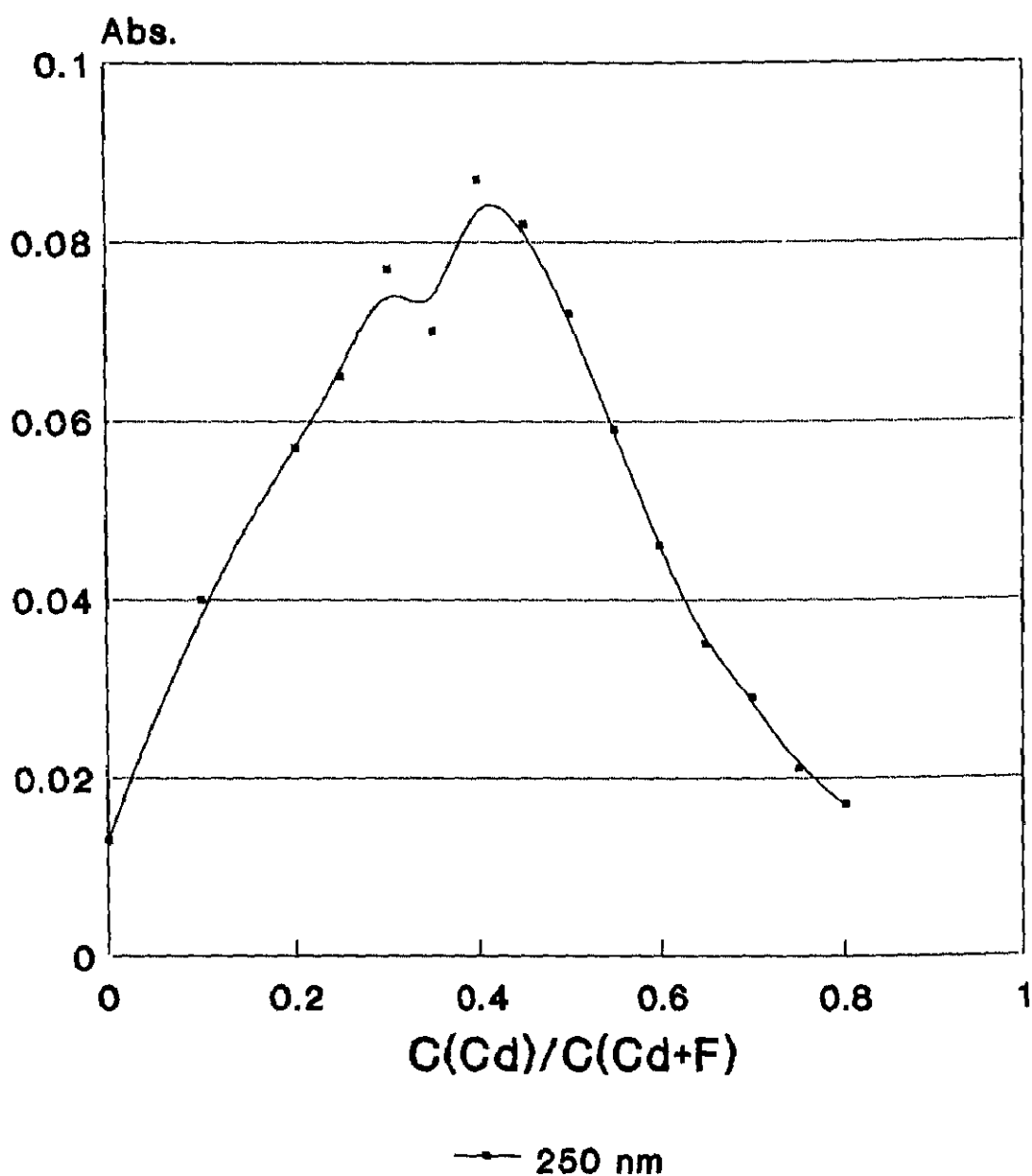


Fig. 40. Método de las variaciones continuas para una disolución de fragmento terminal 56-61 en tampón TRIS $2.5 \cdot 10^{-2}\text{M}$ (pH 7.5) al que se adiciona cadmio.

realizado se considere limitado aporta una idea sobre la capacidad de complejación del fragmento.

d) Adiciones de CdCl_2 a una disolución de fragmento preparada en tampón fosfato y en atmósfera inerte

En este caso hemos preparado catorce disoluciones de fragmento mas CdCl_2 en fosfato $5.0 \cdot 10^{-2} \text{M}$, cuya concentración total era de $6.92 \cdot 10^{-5} \text{M}$. Al representar la absorbancia a una longitud de onda de 250 nm frente a la fracción molar de cadmio añadido a la disolución, figura 41, se observan resultados análogos a los obtenidos en TRIS y tampoco nos permiten concluir sobre una estequiometría clara del complejo cadmio-fragmento.

e) Estudio en función del pH de una disolución del fragmento 56-61 en presencia de cadmio.

Se preparó una disolución de fragmento a la que se añade CdCl_2 , a una concentración dada, en TRIS $2.5 \cdot 10^{-1} \text{M}$. En este caso se hace variar el pH entre 1.5 y 12.0.

Algunos de los espectros UV se indican en la figura 42. El máximo de absorción sufre el proceso ya comentado en el apartado dedicado al estudio del pH para una disolución de fragmento. El hombro debido a los complejos Cd-S aparece a pH mayores a cuatro, $\text{pH} > 4$ (curva 2-5), aumentando de absorción hasta que se alcanza un pH mayor de 7.0 (curvas 3 y 4), en el que se observa una estabilización de la señal que se mantiene hasta pH cercanos a 10.0 (curva 5), momento en el que comienza a aumentar. Cuando se representa la absorbancia a diferentes longitudes de onda en función del pH (fig. 43), se observa el valor del pH para el cual el complejo cadmio-fragmento se disocia, $\text{pH} < 4$, a $\text{pH} > 4$ el complejo se encuentra formado.

Absorbancia a 250 nm en función del Cadmio añadido al fragmento

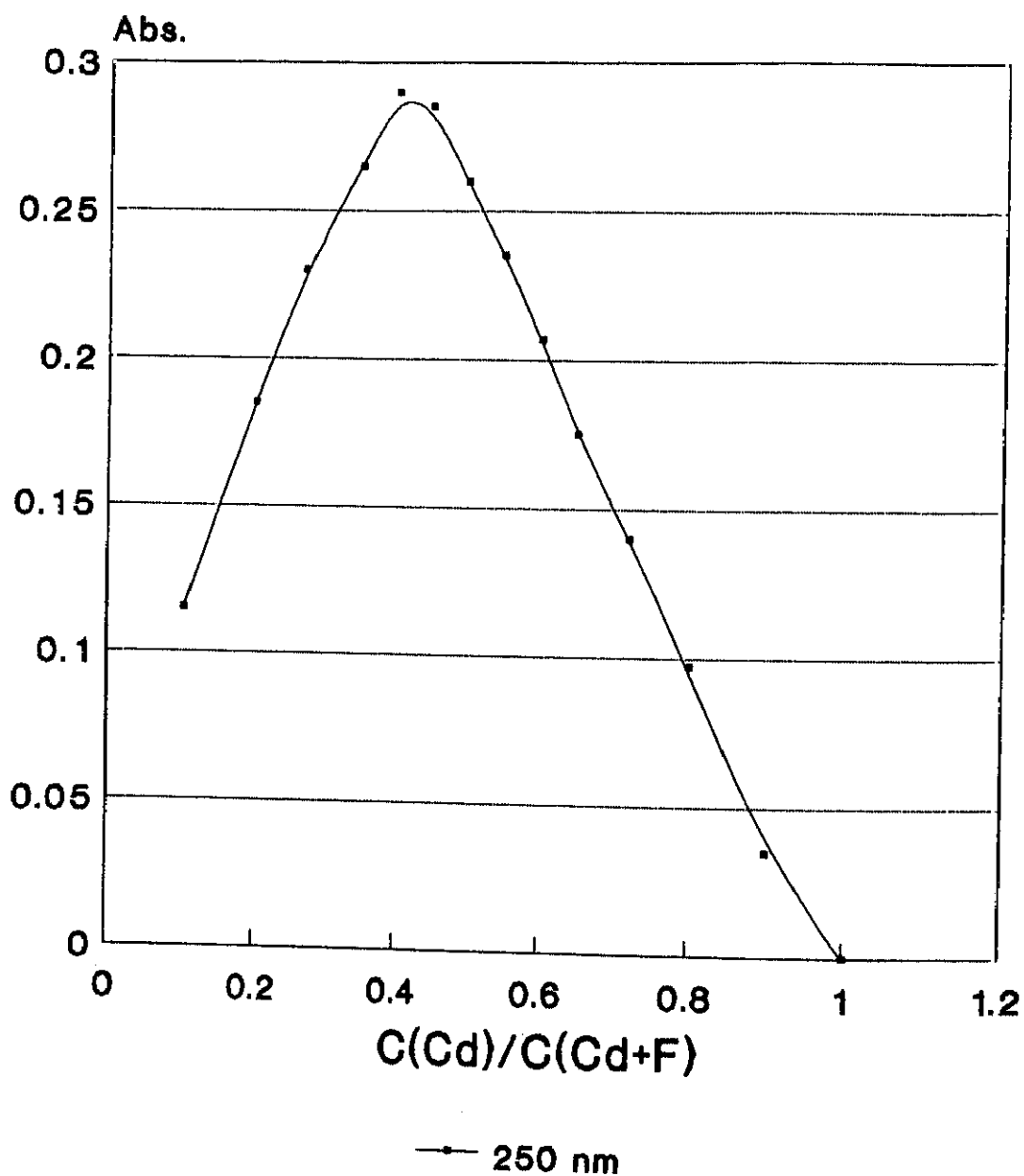


Fig. 40. Método de las variaciones continuas para una disolución de fragmento terminal 56-61 en tampón fosfato $5.0 \cdot 10^{-2}\text{M}$ al que se adiciona cadmio.

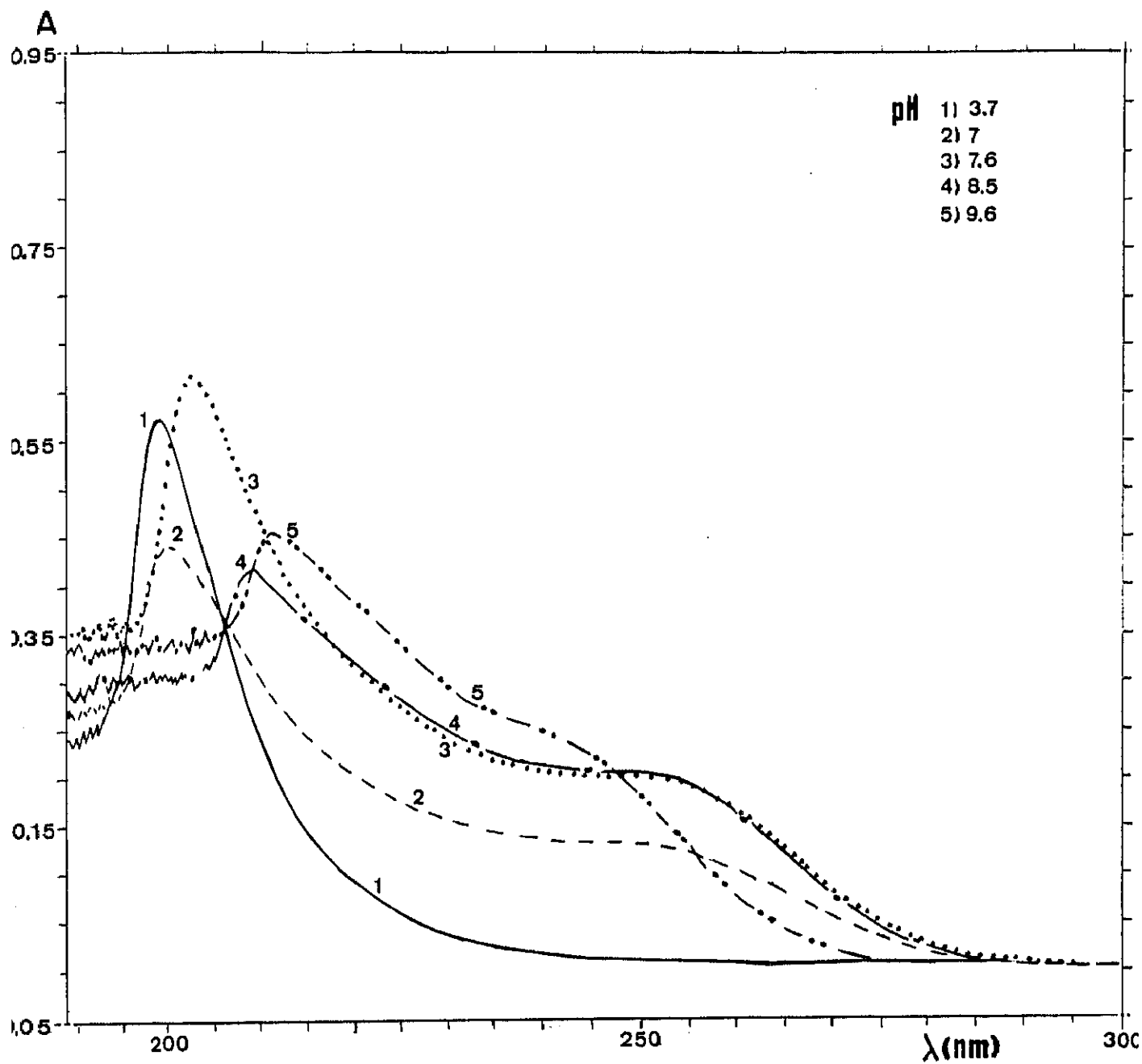


Fig.42 Evolución en función del pH de una disolución que contiene $4.5 \cdot 10^{-3}$ M de fragmento terminal 58-81 y $8.65 \cdot 10^{-5}$ M de Cd^{2+}

Absorbancia a 220, 240 y 250 nm en función del pH del F+Cd

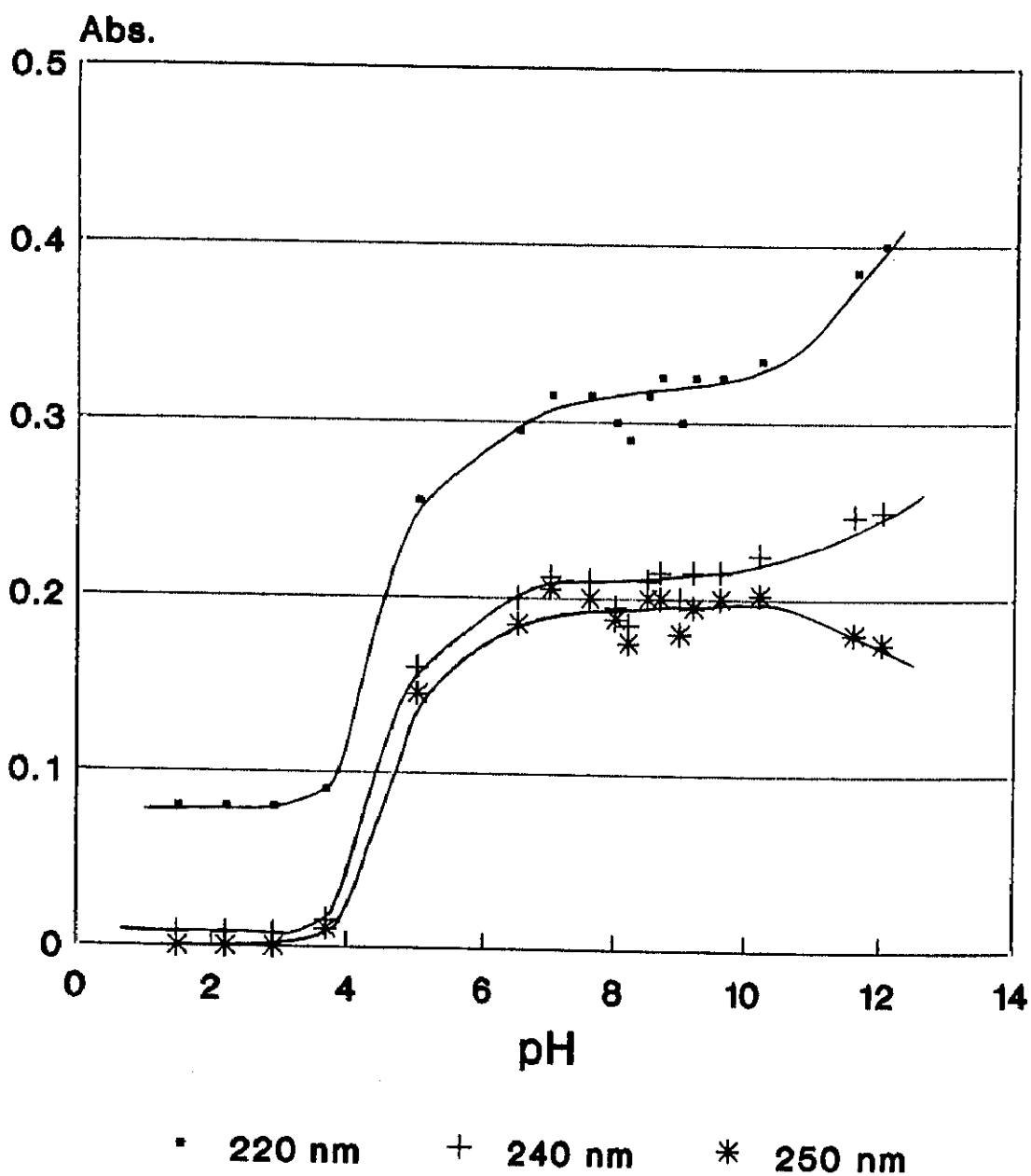


Fig.43 Absorbancia a 220, 240 y 250 nm de una disolución de fragmento ($4.5 \cdot 10^{-3}M$) mas c_{dmzo} ($8.65 \cdot 10^{-3}M$) en función del pH del medio TRIS HCl $2.5 \cdot 10^{-2}M$

Se preparó otra disolución de fragmento sobre la que se añade CdCl_2 en fosfato $5.0 \cdot 10^{-2} \text{M}$ en función del pH, cuyo intervalo osciló de 1.95 a 11.8.

El comportamiento observado es totalmente análogo al que se obtuvo en el TRIS, tal y como se muestra en la figura 44 en que se representa el perfil espectrofotométrico de una disolución de fragmento mas cadmio en medio fosfato a varios de los pH estudiados. Si se representa la absorbancia a diferentes longitudes de onda en función del pH (fig. 45), se puede comprobar como a partir de $\text{pH} < 4.5$ no existe absorbancia correspondiente a los enlaces Cd-S , sin embargo a partir de $\text{pH} > 7.5$ la absorbancia se mantiene practicamente constante, por lo tanto, el valor de pH de disociación del complejo es 4.5.

f) Adiciones de ZnCl_2

A título comparativo, se ha realizado un ensayo de la interacción de los cationes zinc(II) con el fragmento en medio TRIS $2.5 \cdot 10^{-2} \text{M}$ y $5.0 \cdot 10^{-2} \text{M}$. Los resultados obtenidos fueron análogos en ambos medios utilizados. En la figura 46 se muestran los espectros obtenidos, a título de ejemplo, en el segundo de los medios. En ella se puede comprobar que el pico de absorción situado a 205 nm disminuye a medida que se adiciona ZnCl_2 , ya que disminuyen el número de grupos tiólicos libres al pasar a formar enlaces zinc-tiol. La formación de estos enlaces se traduce en la aparición del hombro característico de este enlace que absorbe en el intervalo de longitudes de onda citado.

Cuando se representa la absorbancia a $\lambda = 250 \text{ nm}$ en función de la relación de concentraciones existente entre el zinc y el fragmento se obtiene la curva representada en la figura 47. Al igual que ocurría para el cadmio, la curva nos muestra la saturación del fragmento con cationes zinc libres, en este caso se produce a partir de una relación de concentraciones 2.5-3.

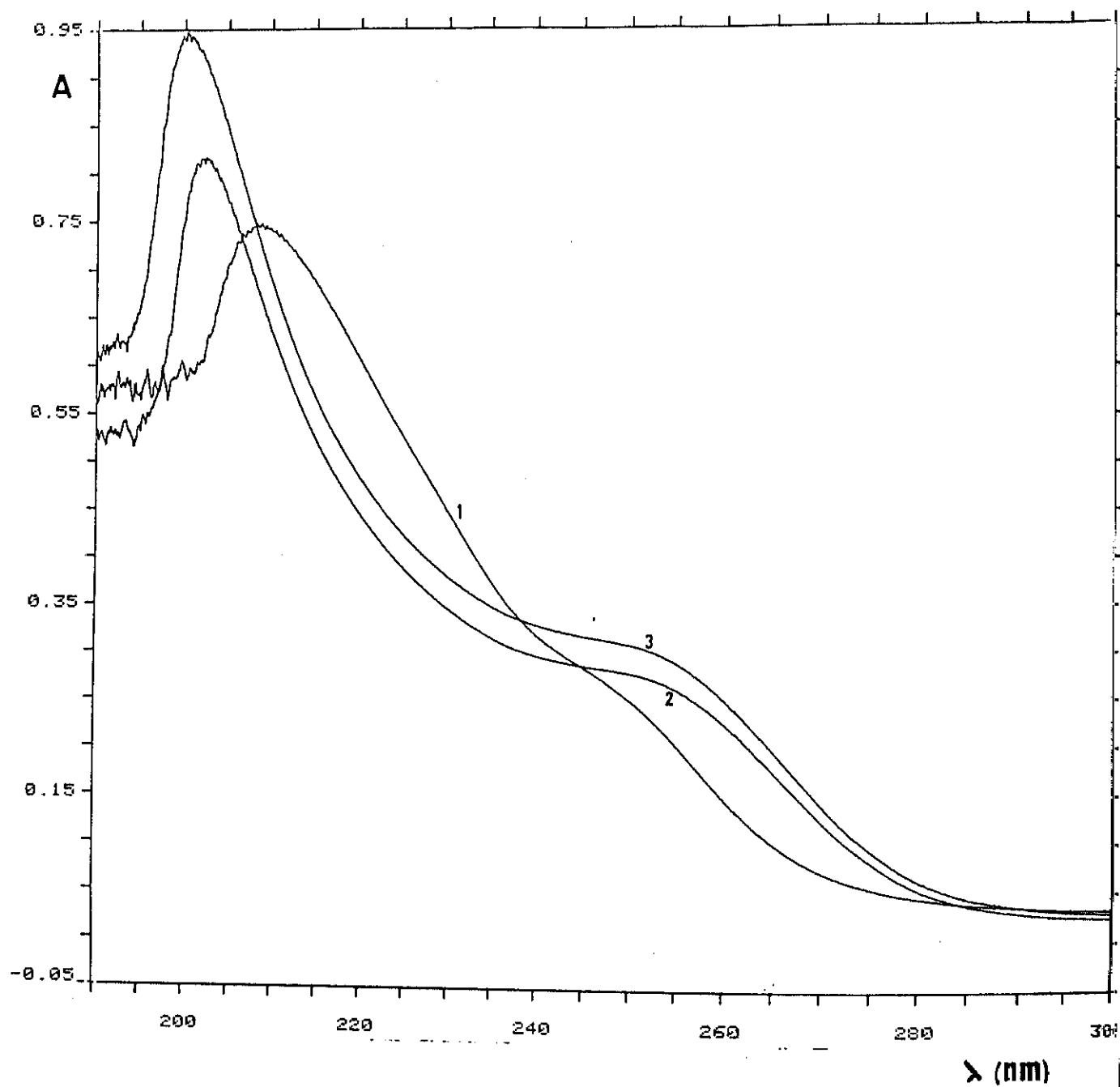
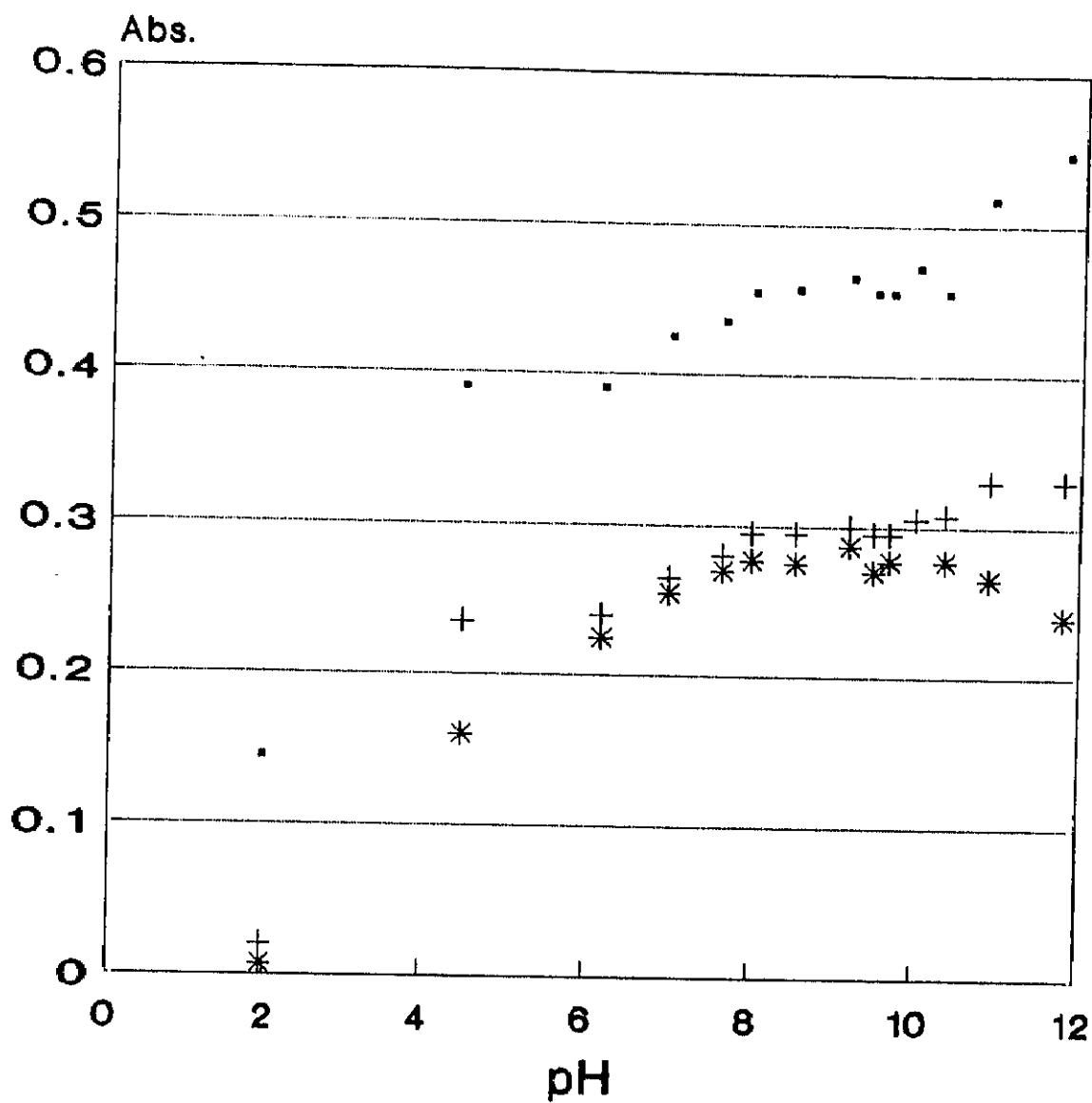


Fig. 44. Evolución de los perfiles de absorción U.V. de una disolución de fragmento ($3.74 \cdot 10^{-5}$ M) más cadmio ($3.63 \cdot 10^{-5}$ M) en tampón fosfato a diferentes pH: a) 11, b) 8 y c) 7.



• 220 nm + 240 nm * 250 nm

Fig. 45. Representación de la absorbancia a 220, 240 y 250 nm de una disolución de fragmento ($3.74 \cdot 10^{-5}$ M) más cadmio ($3.63 \cdot 10^{-5}$ M) en función del pH de la disolución de fosfato.

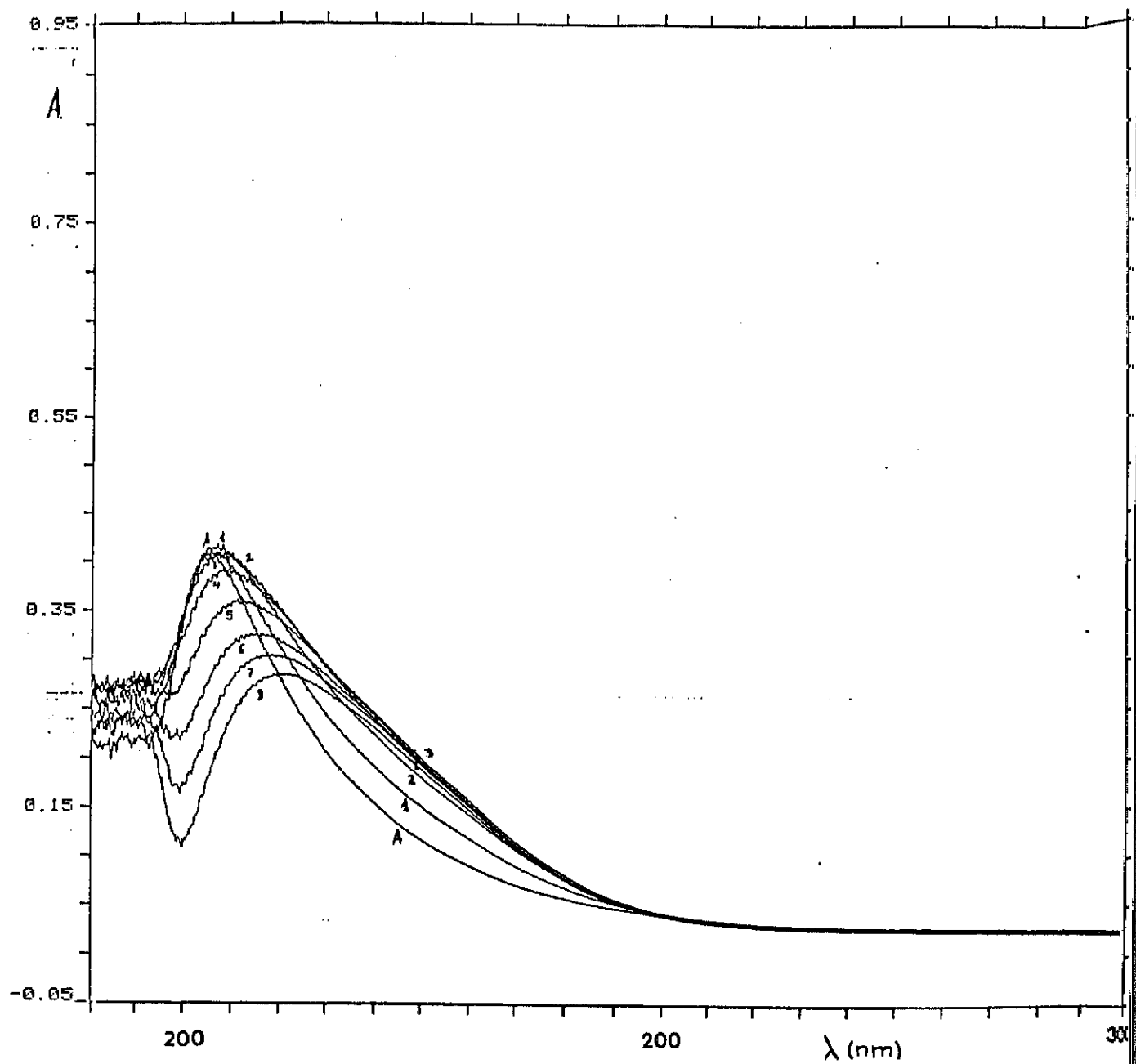


Fig. 46 Modificación del espectro ultravioleta de una disolución ($2.53 \cdot 10^{-5}M$) de fragmento terminal 58-61 tras las sucesivas adiciones de $ZnCl_2$ cuyas concentraciones oscilaron entre 3.0 y $29.6 \cdot 10^{-5}M$ en TRIS $5.0 \cdot 10^{-2}M$

Absorbancia a 250 nm en función del Zinc añadido al fragmento

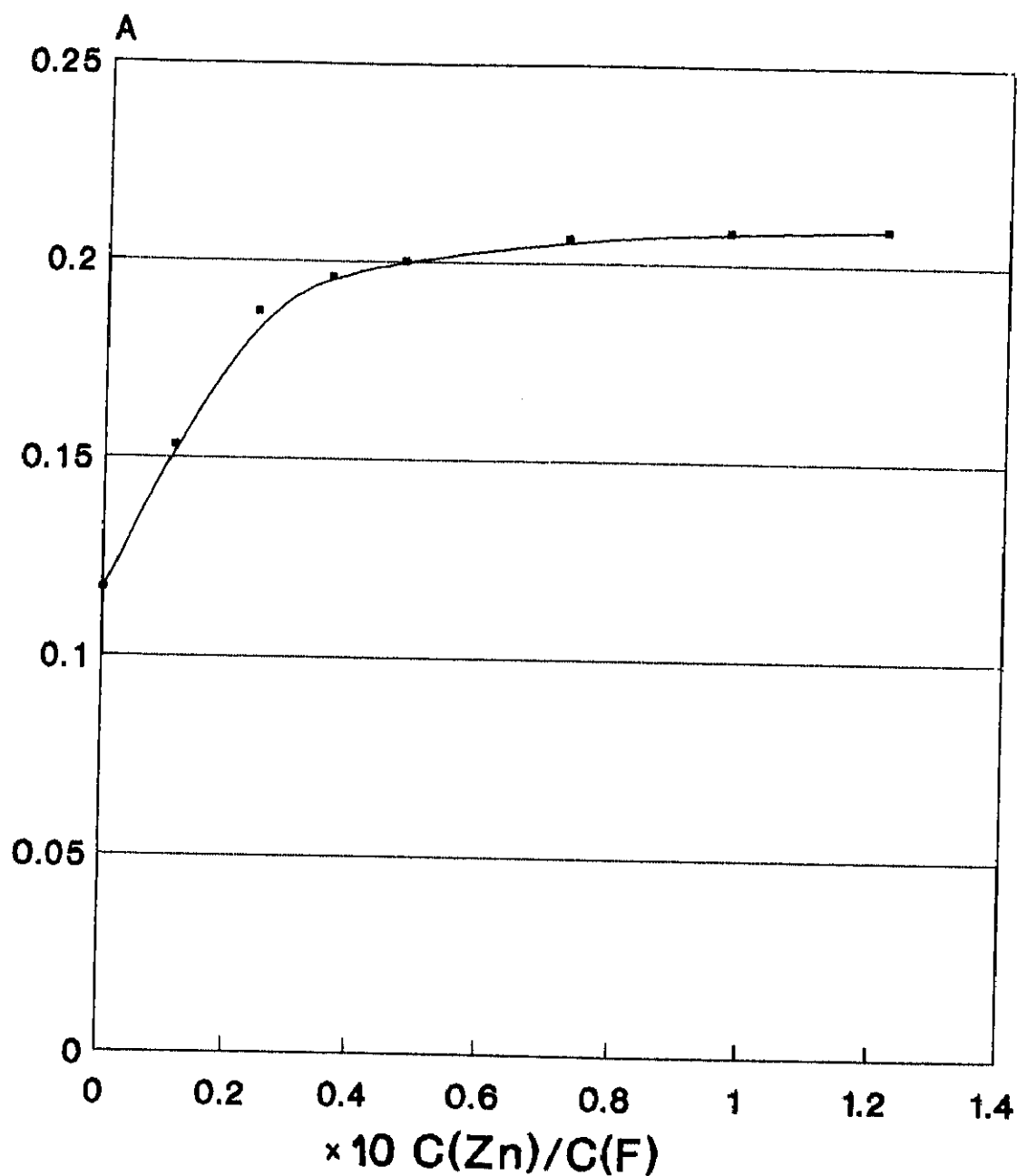


Fig.47 Absorbancia a 250 nm en función de la relación molar de concentraciones zinc/fragmento

La diferencia en cuanto a la concentración de cadmio y zinc que son capaces de saturar al fragmento es probable que sea debida a que, el cadmio solo se une a los grupos tiólicos, mientras que el zinc también lo hace con los grupos amino del péptido.

IV.C.3.D. ESTUDIO DE LA ABSORBANCIA EN FUNCION DE LA CONCENTRACION

El estudio de la variación de la absorbancia en función de la concentración de fragmento en disolución se ha efectuado para dos concentraciones de TRIS diferentes $5.0 \cdot 10^{-2}M$ y $2.5 \cdot 10^{-2}M$. Así mismo, para esta última se han llevado a cabo dos ensayos independientes, uno en presencia de oxígeno del aire y otro en atmósfera inerte de N_2 en una caja de guantes. Algunos de los espectros obtenidos se muestran en las figuras 48-50. Se observa que los espectros en la zona de longitudes de onda más cortas están mejor definidos si se realizan las experiencias en ausencia de oxígeno, pero la diferencia no es significativa. Así, se pueden determinar las absorbancias a las longitudes de onda correspondientes a los máximos de absorción en todos los casos.

La representación de $A=f(c)$ se muestra en la figura 51. La pendiente para una concentración de TRIS de $2.5 \cdot 10^{-2}M$ es la misma en ausencia y en presencia de oxígeno. Sin embargo existe una ligera variación del coeficiente de absorción molar si se varía la concentración de TRIS empleada. En la tabla se agrupan los valores obtenidos de ϵ , en las diferentes condiciones, así como el intervalo de concentración empleado.

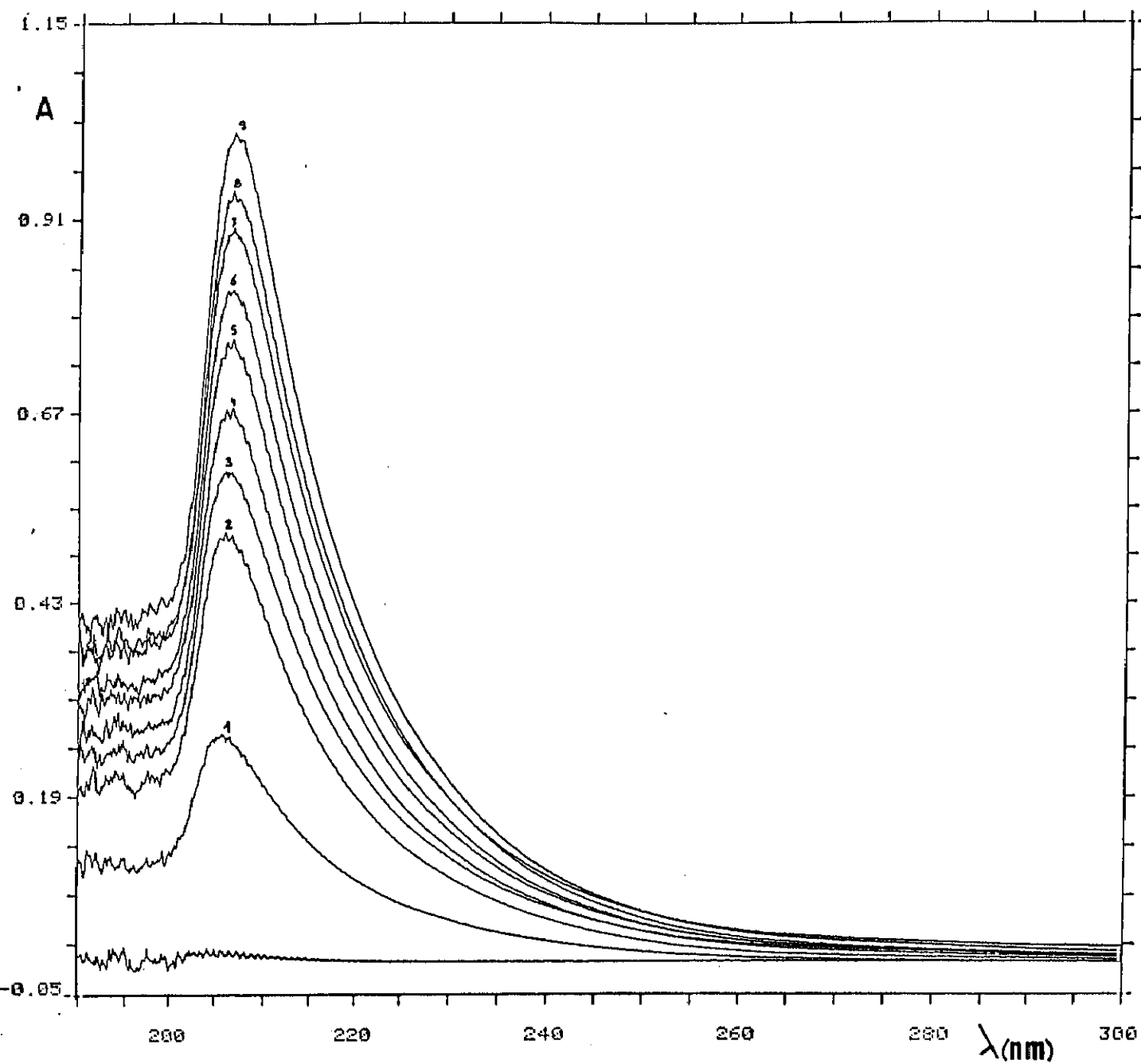


Fig. 48. Espectros de absorción U.V. para diferentes concentraciones del fragmento terminal 56-61 en TRIS HCl $5.0 \cdot 10^{-2}M$ a pH 7.5

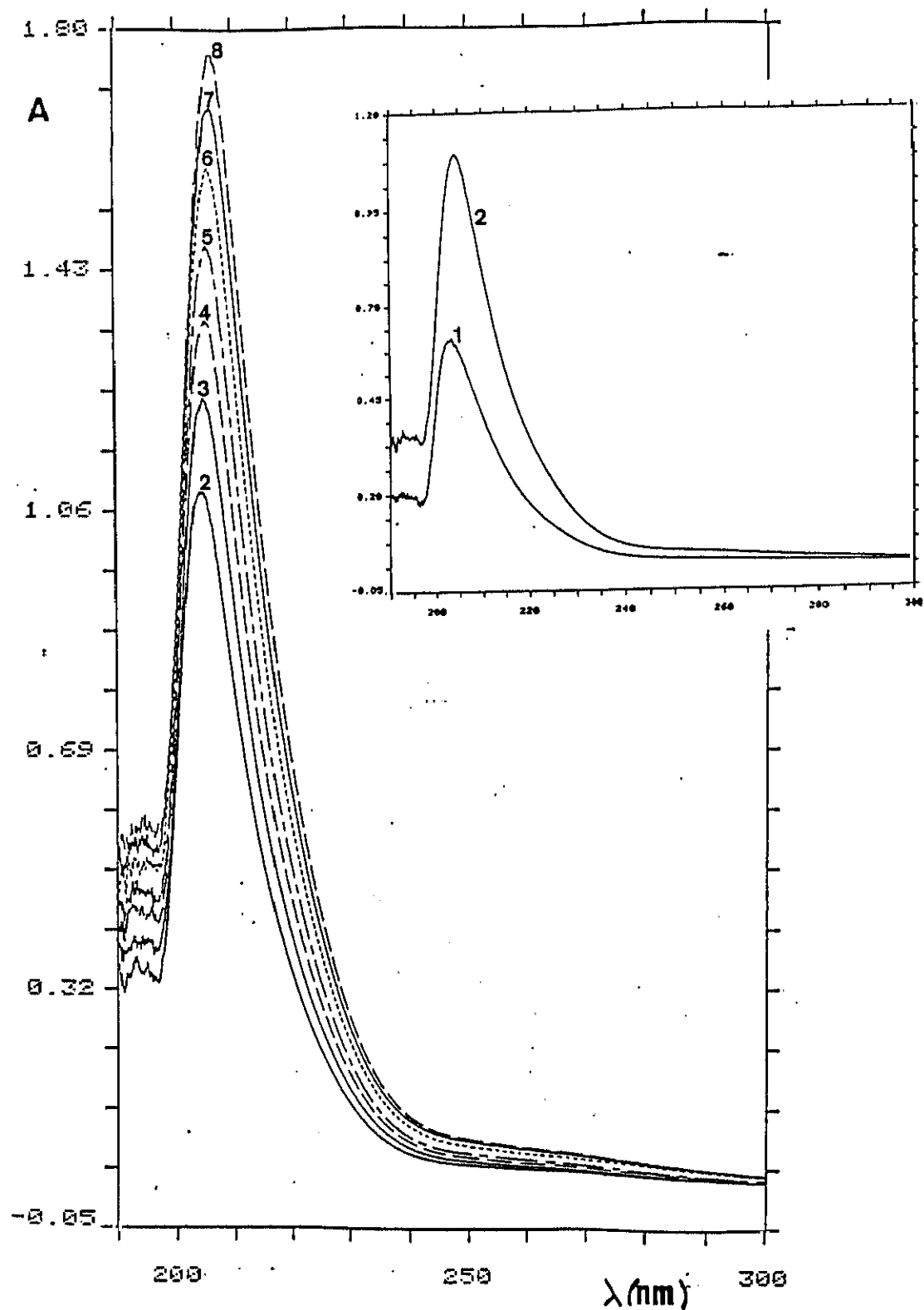


Fig. 49. Espectros de absorción U.V. para diferentes concentraciones del fragmento terminal 56-61 en TRIS HCl $2.5 \cdot 10^{-2}M$ a pH 7.5

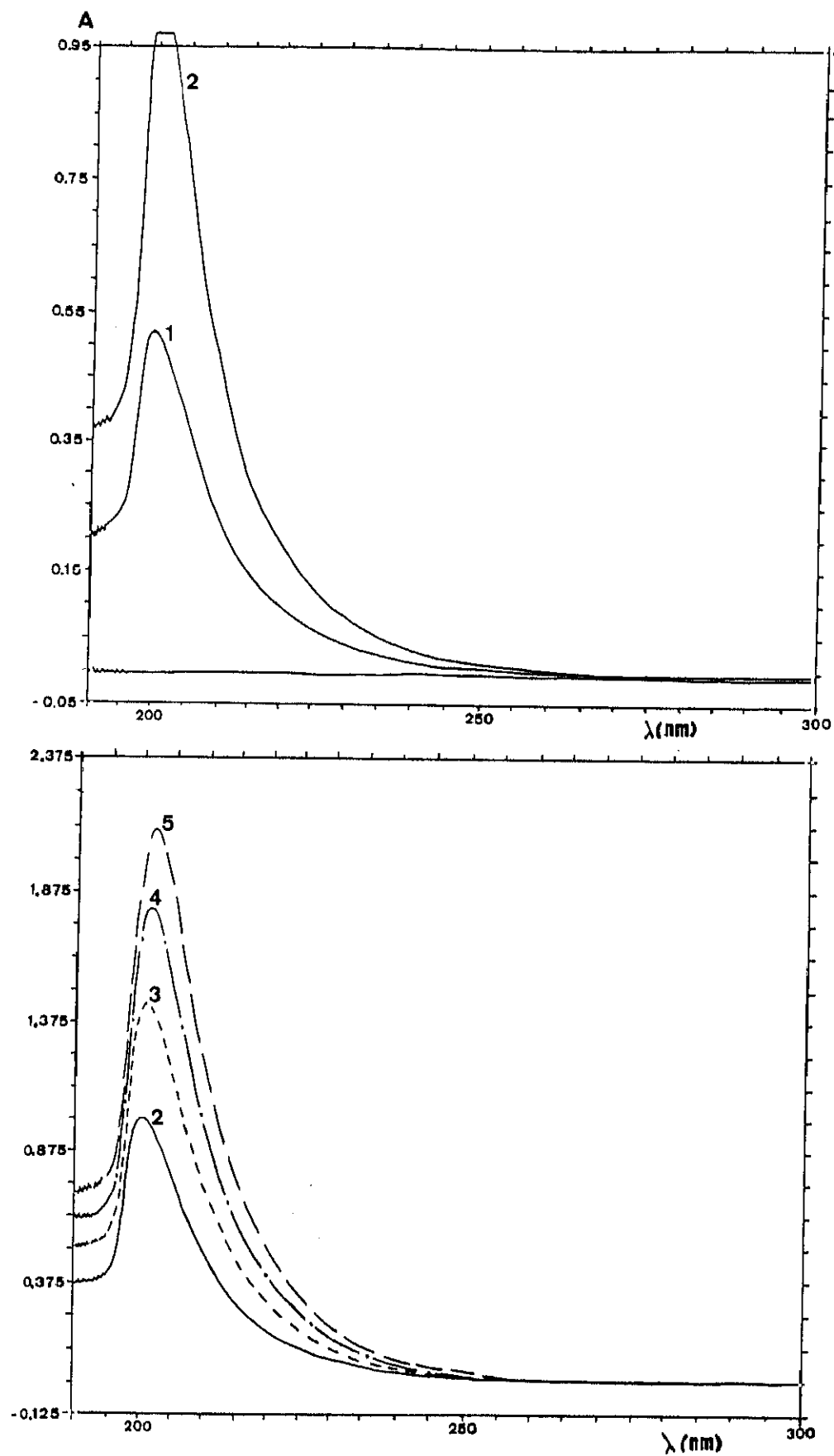


Fig. 50. Espectros de absorción U.V. para diferentes concentraciones del fragmento terminal 56-61 en TRIS HCl $2.5 \cdot 10^{-2}M$ a pH 7.5

Absorbancia en el máximo en función de la concentración de fragmento

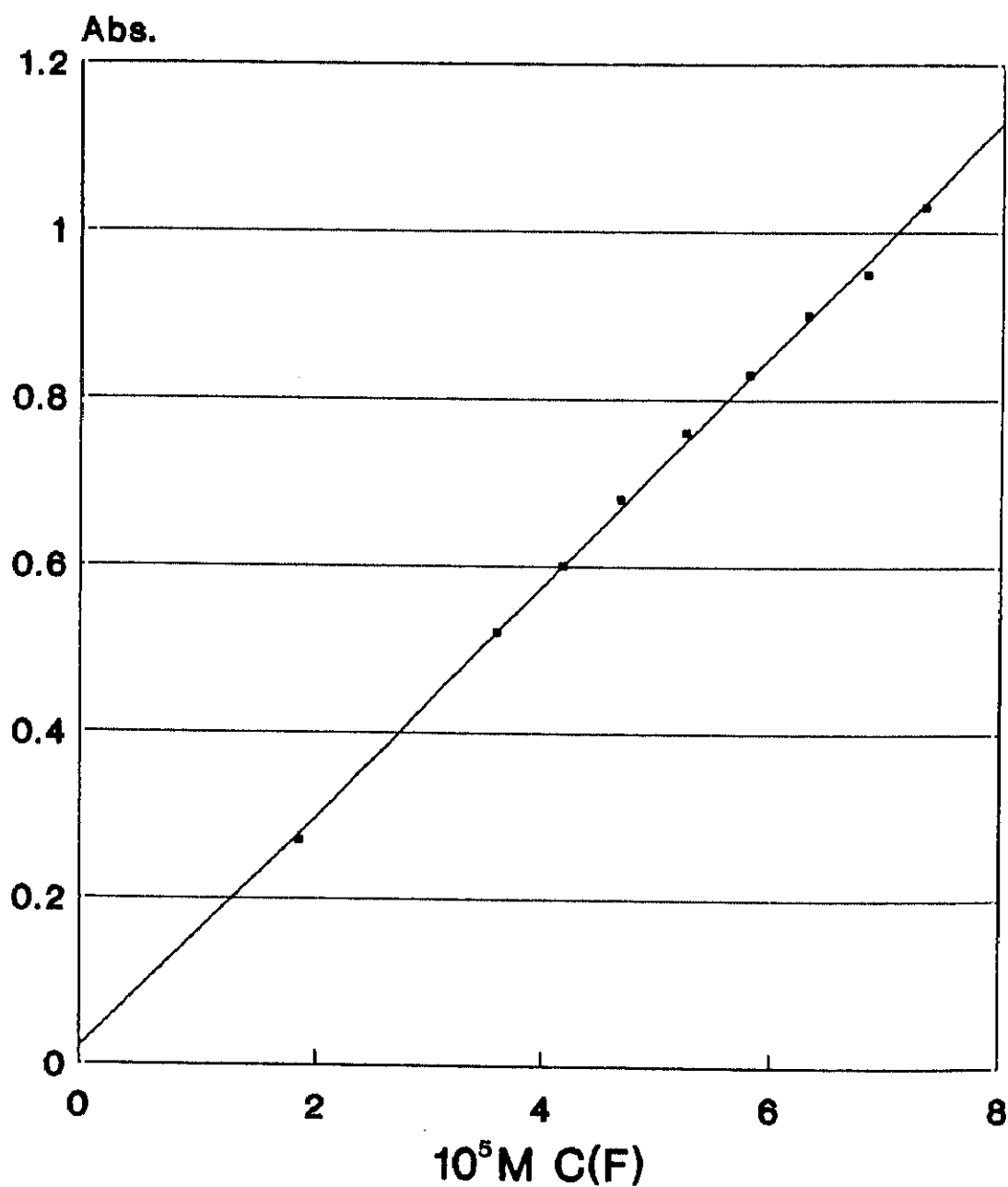


Fig. 51a. Representación de la absorbancia en función de la concentración de fragmento a la longitud de onda del máximo de absorción.

Absorbancia en el máximo en función de la concentración de fragmento

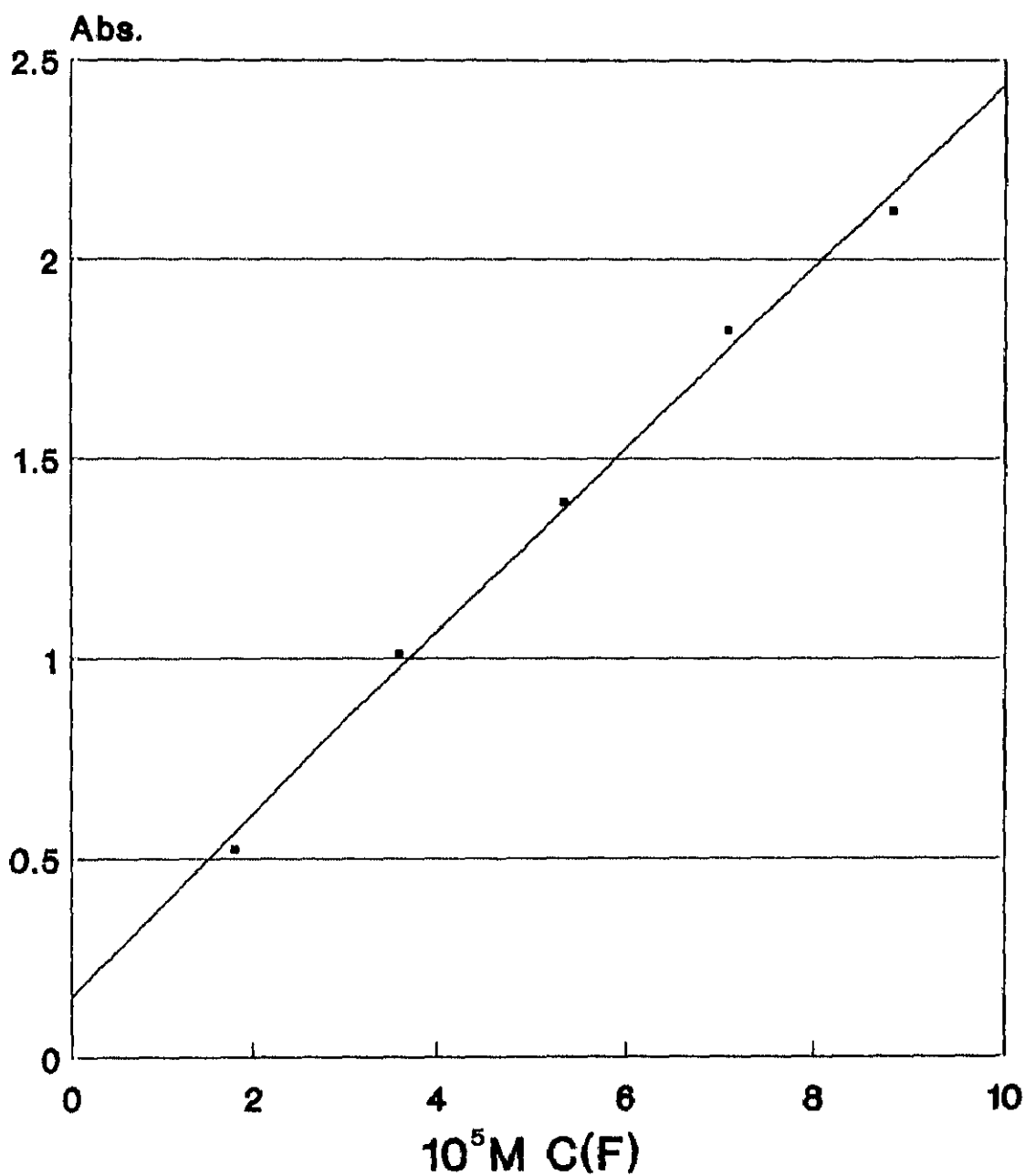


Fig. 51b. Representación de la absorbancia en función de la concentración de fragmento a la longitud de onda del máximo de absorción.

Tabla 20. Intervalos de concentración y ξ para el fragmento en diferentes condiciones

M E D I O TRIS	INTERVALO DE CONC. ($\times 10^{-5}$)	$\xi_{\lambda_{\text{MAX}}}$
$5.0 \cdot 10^{-2} \text{M}$ ausencia O_2	1.85-7.33	$1.38 \cdot 10^4$
$2.5 \cdot 10^{-1} \text{M}$ ausencia O_2	1.80-6.80	$2.24 \cdot 10^4$
$2.5 \cdot 10^{-1} \text{M}$ presencia O_2	1.79-8.82	$2.28 \cdot 10^4$

Las experiencias realizadas en presencia o no de oxígeno son comparables.

IV.C.4. METALOTIONEINAS

Como se ha señalado numerosas veces a lo largo del estudio bibliográfico realizado sobre las metalotioneínas y expuesto en el capítulo II de esta memoria, estas moléculas presentan un comportamiento espectrofotométrico característico y derivado de su composición. Es decir, presentan un máximo de absorción cercano a los 200 nm atribuido a los grupos tiólicos libres, los enlaces amida y los grupos hidroxílicos, además, presentan un hombro debido a los enlaces metal-tiol (3,11,12,19,24,30,45,66,72,83,87,95,102,112,117,122,133-140). La longitud de onda a la que el hombro aparece depende del enlace y, por lo tanto, de la naturaleza del catión metálico (tabla 16). Como se ha indicado, las MT contienen más de un catión metálico, por lo tanto, en esa región de longitudes de onda del espectro UV, la absorción corresponde a la superposición de diferentes contribuciones.

IV.C.4.A. ESTABILIDAD DE LA METALOTIONEINA

La metalotioneína es una proteína y, como tal compuesto orgánico, no es muy estable, aunque ésta es considerada como una de las de mayor estabilidad.

Una consecuencia de la falta de estabilidad sería la desnaturalización de la MT, que tendría como consecuencia una pérdida de la estructura cuaternaria, lo que provocaría que los cationes estuvieran unidos de forma más débil, pudiendo ocasionarse su liberación. Como consecuencia de su liberación quedarían grupos tiólicos libres que podrían dar lugar a la formación de puentes disulfuro. Otras desnaturalizaciones más drásticas provocarían la ruptura de la molécula, la precipitación.

Para comprobar la estabilidad de la MT se ha determinado un perfil espectrofotométrico de una MT en función del tiempo.

Se prepara una disolución de $1.33 \cdot 10^{-5} \text{M}$ de MT en TRIS $2.5 \cdot 10^{-2} \text{M}$, se realiza el barrido espectrofotométrico, $A=f(\lambda)$, recién preparada y a intervalos de tiempo dados: 18h, 96h y 168h; siempre se mantuvo en nevera, a 4°C , durante los intervalos de tiempo comprendidos entre las diferentes lecturas.

El perfil U.V. obtenido a tiempo cero se mantuvo constante a lo largo del periodo estudiado, tal y como se puede observar cuando se representa la absorbancia, a tres longitudes de onda diferentes, correspondientes al máximo y al hombro debido al enlace metal-tiolato, en función del tiempo transcurrido (fig. 52). De ello se puede deducir que la MT, en estas condiciones específicas, no se altera aparentemente, ni en su parte orgánica de la que depende la absorción a 200 nm, ni se produce una liberación de los cationes ligados puesto que el hombro se mantiene inalterado.

Absorbancia a 204, 240 y 250 nm en función del tiempo (horas)

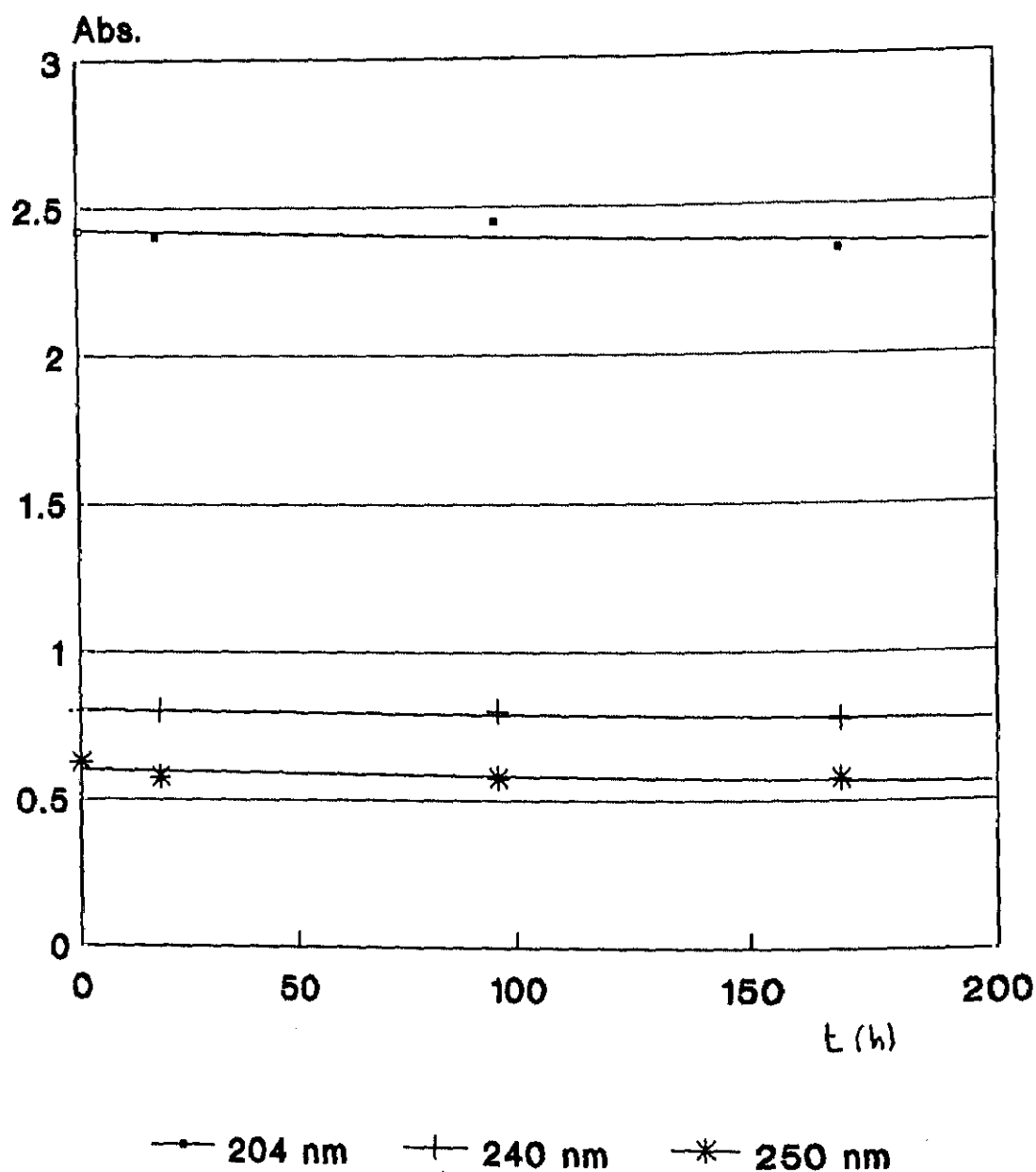


Fig. 52. Representación de la absorbancia a tres longitudes de onda diferentes, 204, 240 y 250 nm, en función del tiempo para una disolución de fragmento.

IV.C.4.B. INFLUENCIA DEL MEDIO

Analogamente a lo descrito en el caso de la cisteína y del fragmento, se ha realizado un ensayo para estudiar la influencia del medio en el espectro de absorción U.V. de la MT. Se han elegido dos medios de diferente naturaleza, TRIS y fosfato, el primero de ellos a diferentes concentraciones.

Los espectros obtenidos se muestran en las figuras 53a y b. En ellas se puede ver cómo la señal se ve exaltada por la presencia de TRIS·HCl, más que por el fosfato; aunque en ambos casos el perfil es muy similar. Existe un desplazamiento del pico hacia longitudes de onda mayores que puede deberse, en parte, a que el tampón fosfato se encuentra en mayor concentración y que el pH de ambas disoluciones es próximo pero no igual. El efecto de la concentración del tampón se observa claramente en la figura 53 b. Un aumento de la concentración de TRIS produce una disminución de la señal de absorción y un desplazamiento del pico hacia longitudes de onda mayores.

IV.C.4.C. COMPORTAMIENTO DE MT EN FUNCION DEL pH

Como ya se ha señalado varias veces a lo largo de esta memoria, la MT presenta propiedades ácido-base derivadas de su composición aminoacídica. Por lo tanto, su comportamiento espectrofotométrico debe variar en función del pH.

a) MT r.l. EN TRIS $2.5 \cdot 10^{-1}M$

Se ha medido la absorbancia de una disolución de la MT r.l., $3.53 \cdot 10^{-6}M$, en TRIS $2.5 \cdot 10^{-1}M$ en un intervalo de pH que oscila entre 1.5 y 12.0, a diecinueve pH diferentes. Algunos de los espectros mas significativos se muestran en la figura 54. Se puede comprobar que a pH ácidos el máximo aparece a 200 nm, mientras que a pH básicos aparece a 207 nm; este desplazamiento

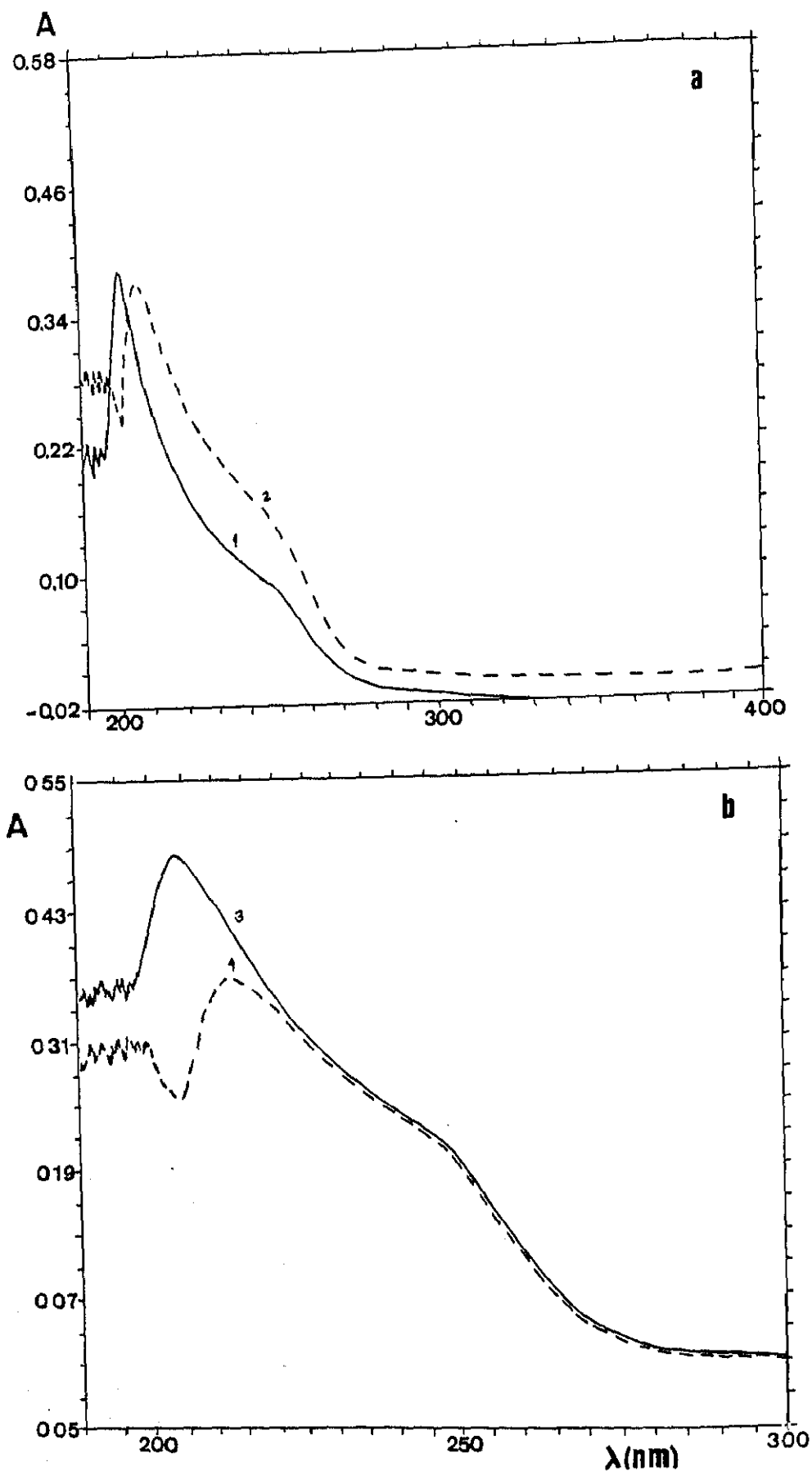
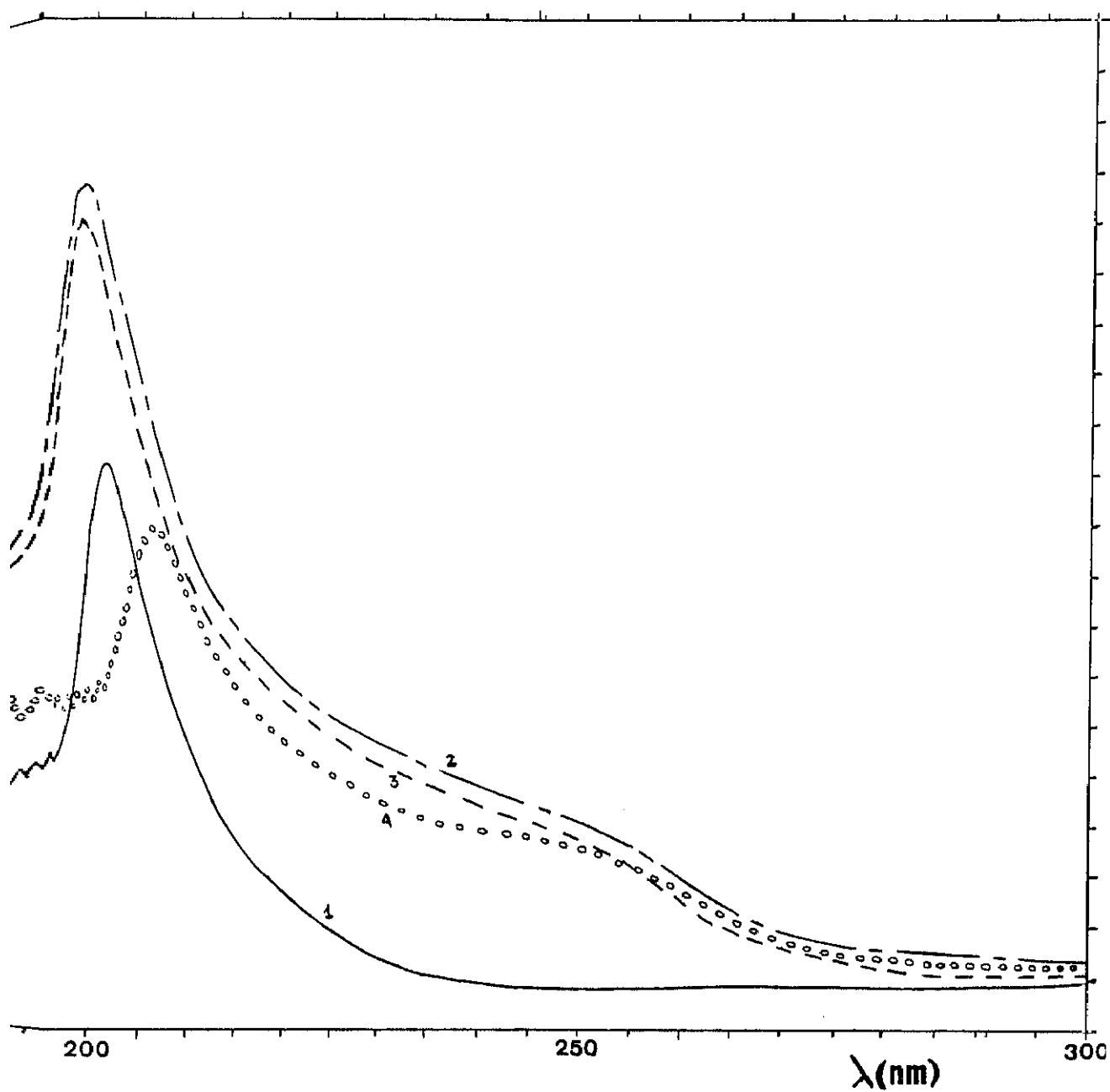


Fig. 53. Espectros de absorción U.V. de una disolución de metalotioneína a diferentes concentraciones en diferentes medios: 1) $2.15 \cdot 10^{-8}$ M en TRIS $2.5 \cdot 10^{-2}$ M a pH 7.5, 2) $5.16 \cdot 10^{-8}$ M en fosfato 0.1 M a pH 6.78, 3) $3.46 \cdot 10^{-8}$ M en TRIS $2.5 \cdot 10^{-2}$ M a pH 7.5, 4) $3.46 \cdot 10^{-8}$ M en TRIS $5.0 \cdot 10^{-2}$ M a pH 7.5



54. Espectros de absorción U.V. de una disolución de Metalotioneína $3.53 \cdot 10^{-5}$ M a diferentes pH: 1) 1.5, 2) 3.7, 3) 6.5 y 4) 8.0.

es análogo al que se observó con la cisteína y el fragmento. Sin embargo, contrariamente a lo que ocurría en el caso de la cisteína y análogamente al fragmento, para la MT la morfología es análoga a pH diferentes, ácidos o básicos. A pH ácidos se observa la desaparición del hombro a 250 nm como consecuencia de la ruptura de los enlaces metal-tiolato y la liberación de los cationes.

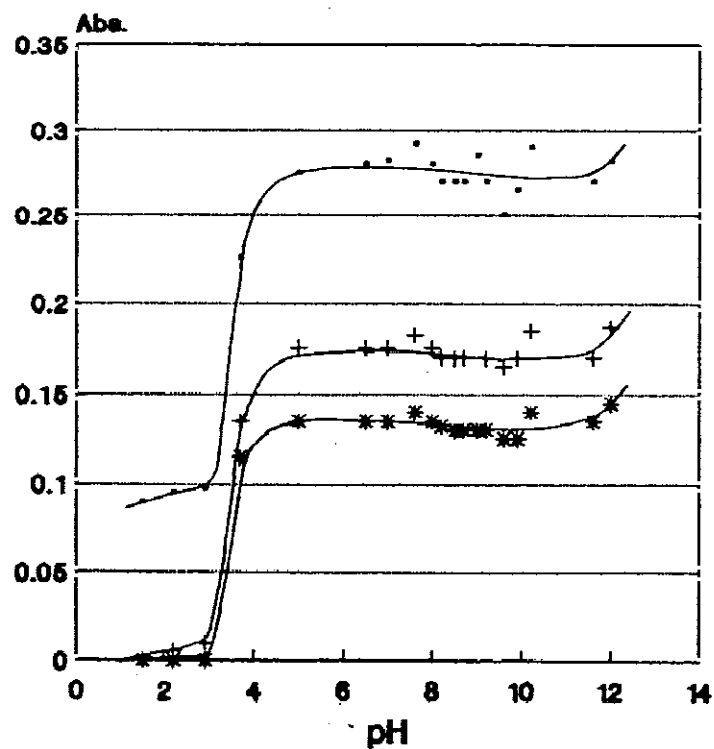
El pK_a de disociación de la MT deducido de manera aproximada por la variación de la absorbancia en función del pH, $A=f(pH)$ de la figura 55, es próximo a 4. Este valor es parecido al que se ha determinado por este método y que se encuentra en la literatura. En el caso de la cisteína y del fragmento se ha encontrado como pK_a de disociación un valor comprendido entre 8 y 9. Este valor corresponde a la disociación de los protones asociados a los grupos tiólicos de la molécula. En el caso de la MT como estos grupos tiólicos están asociados a metales el pK_a encontrado para esta molécula corresponde a la disminución de los grupos carboxílico.

b) MT-II r.l. en TRIS $5.0 \cdot 10^{-2}M$

Se ha realizado un estudio espectrofotométrico de otra metalotioneína, en este caso MT-II r.l. Los perfiles de las dos MT estudiadas son análogos, la única diferencia, como se puede ver en la figura 56, es la absorción en el hombro, que es menor en la que presenta menor contenido metálico, MT-II.

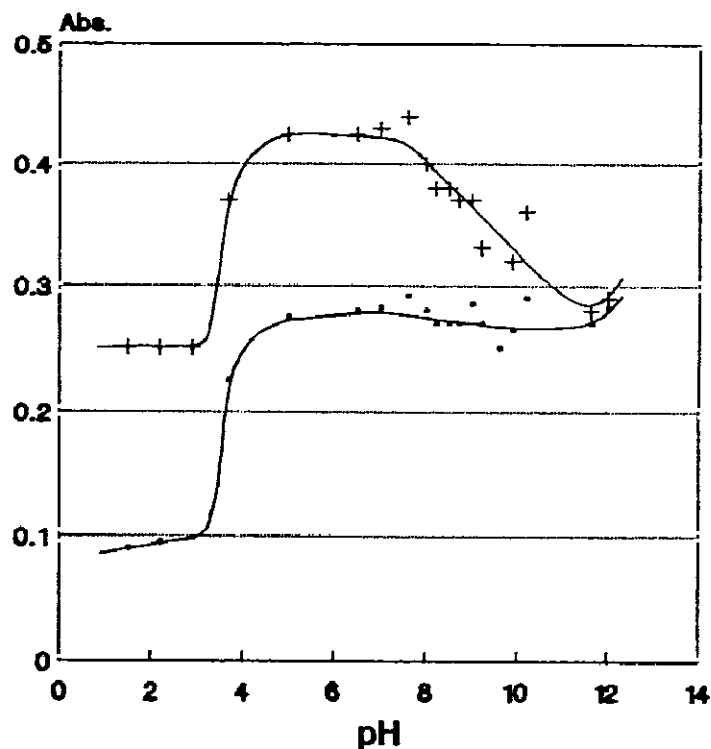
Los perfiles de los espectros obtenidos están representados en la figura 57 a varios pH, en particular a pH básicos. Se observa la influencia de la concentración de TRIS de manera análoga a la indicada anteriormente. Para pH 7 y superiores las curvas para longitudes de onda, λ , superiores a 230 nm que corresponden a la absorción de los cationes ligados a la proteína, están superpuestas lo que indica que para medios neutros o alcalinos existe una especie única independiente del

Absorbancia a 220, 240 y 250 nm en
función del pH de la MT



• 220 nm + 240 nm * 250 nm

Absorbancia a 220 y 210 nm en
función del pH de la MT



• 220 nm + 210 nm

Fig. 55. Representación de la absorbancia a diferentes longitudes de onda: 220, 240, 250 y 210 nm de una disolución de Metalotioneína $3.53 \cdot 10^{-8}$ M en función del pH.

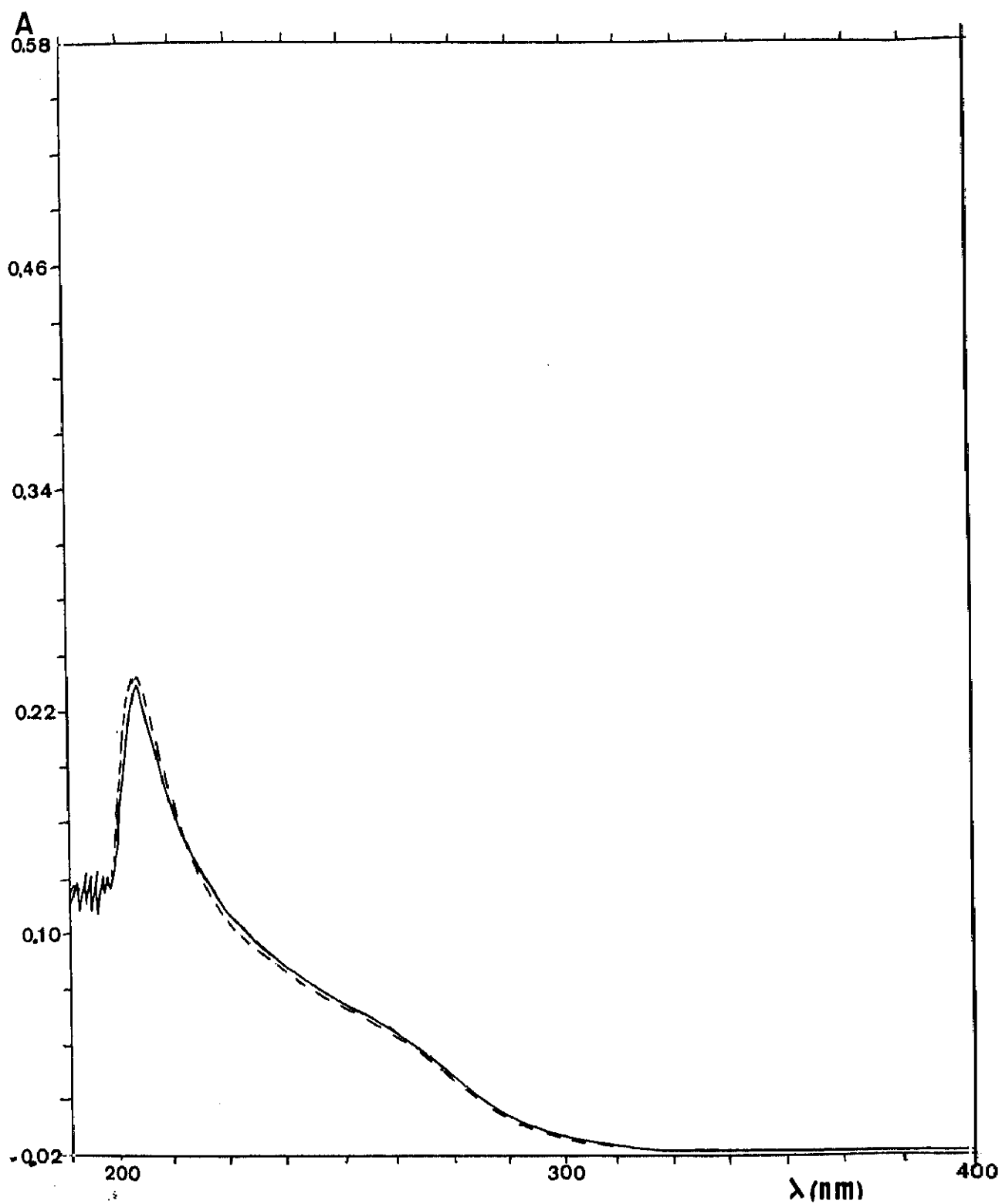


Fig. 56. Representación del espectro de absorbancia de dos disoluciones $1,31 \cdot 10^{-6}$ M una de MT r.l. y otra de MT II r.l. en TRIS HCl $2,5 \cdot 10^{-2}$ M a pH 7.5

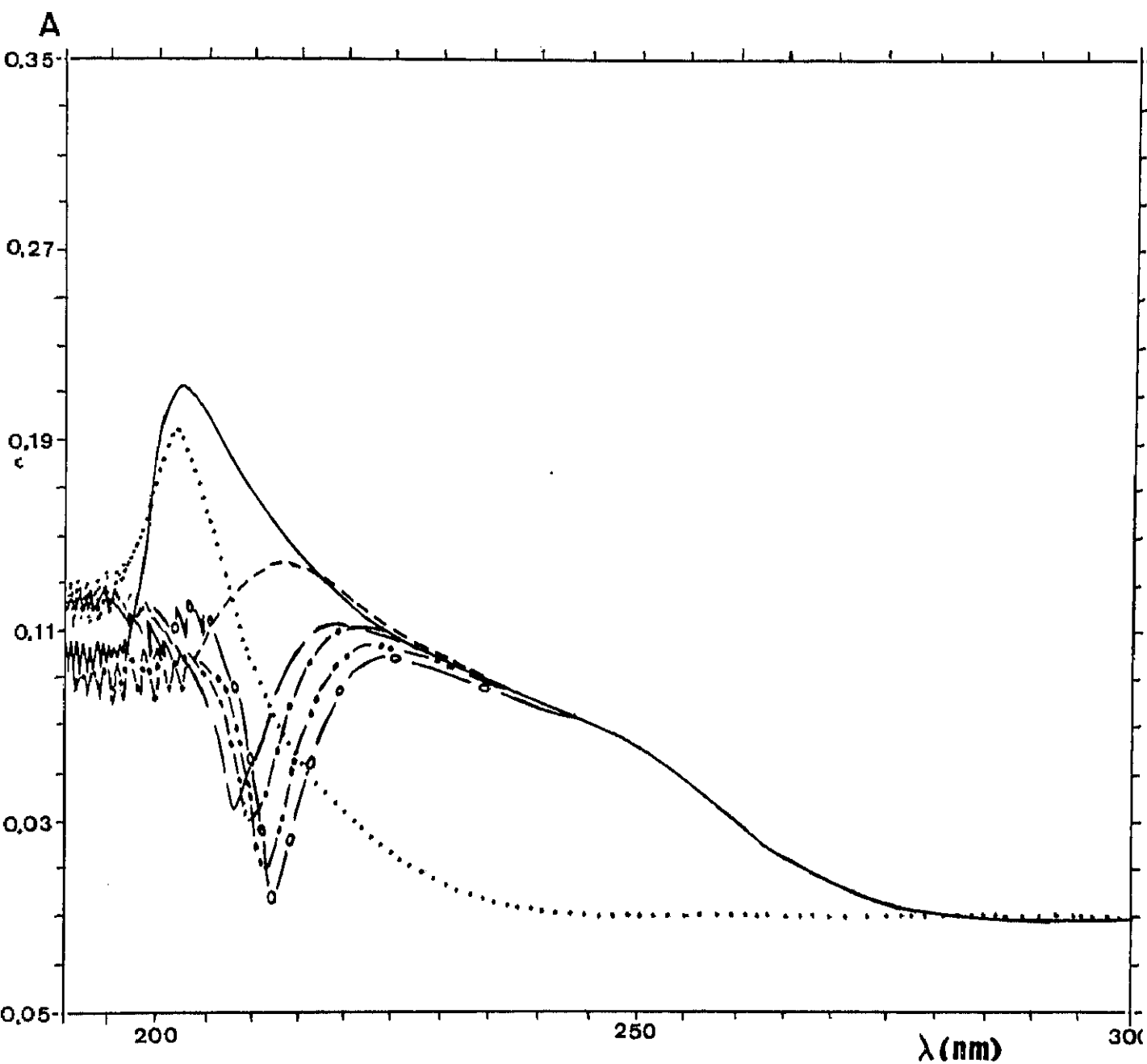


Fig. 57. Espectros de absorción U.V. de una disolución $1,36 \cdot 10^{-6}$ M una de MT II r.l. en TRIS HCl $5.0 \cdot 10^{-2}$ M a diferentes pHs: ($\circ\circ$) 9.5, (\cdots) 9.0, (\dashrightarrow) 8.5, (\longrightarrow) 8.0, (\dashleftarrow) 7.5, (\longleftarrow) 7.0 y ($\cdots\cdots$) 4.5

pH. Sin embargo, en este caso, para pH=4.5 los cationes se encuentran liberados de su enlace con la metalotioneína. Si se compara con lo obtenido en TRIS $2.5 \cdot 10^{-1}$ en que a este pH los cationes se encuentran asociados a la metalotioneína, este hecho parece indicar que la unión metal-tiolato es más débil cuanto más concentrado sea el medio en que está disuelta la MT, por lo tanto puede existir una competencia entre TRIS y la tioneína como ligando de cadmio y zinc.

c) MT-II r.l. en fosfato $5.0 \cdot 10^{-4}$ M

Se ha medido la absorbancia de una disolución $4.49 \cdot 10^{-6}$ M de la MT r.l. en fosfato $5.0 \cdot 10^{-4}$ M en un intervalo de pH que oscila entre 1.55 y 12.0, a once pH diferentes. La evolución de los espectros es totalmente análogo a las anteriores. Los espectros obtenidos se muestran en la figura 58. Se puede comprobar que a pH ácidos el máximo aparece a 191 nm, mientras que a pH básicos aparece a 201 nm; este desplazamiento es análogo al que se observó con la cisteína y el fragmento. Sin embargo, contrariamente a lo que ocurría en el caso de la cisteína y análogamente al fragmento, para la MT la morfología es análoga a pH diferentes, ácidos o básicos. A pH ácidos se observa la desaparición del hombro a 250nm como consecuencia de la ruptura de los enlaces metal-tiolato y la liberación de los cationes.

A partir de la representación de la absorbancia en función del pH para diferentes longitudes de onda (figura 59) se puede conocer de manera aproximada el valor de la constante de disociación de la metalotioneína. Así mismo se puede indicar que el valor del pH para el cual los complejos metal-tioneína están completamente disociados por disminución del pH de la disolución. Así, para pH>6 la presencia del hombro a una longitud de onda comprendida entre 225 y 255 nm indica que los complejos metal-tioneína son estables mientras que para pH>3 éstos se encuentran disociados.

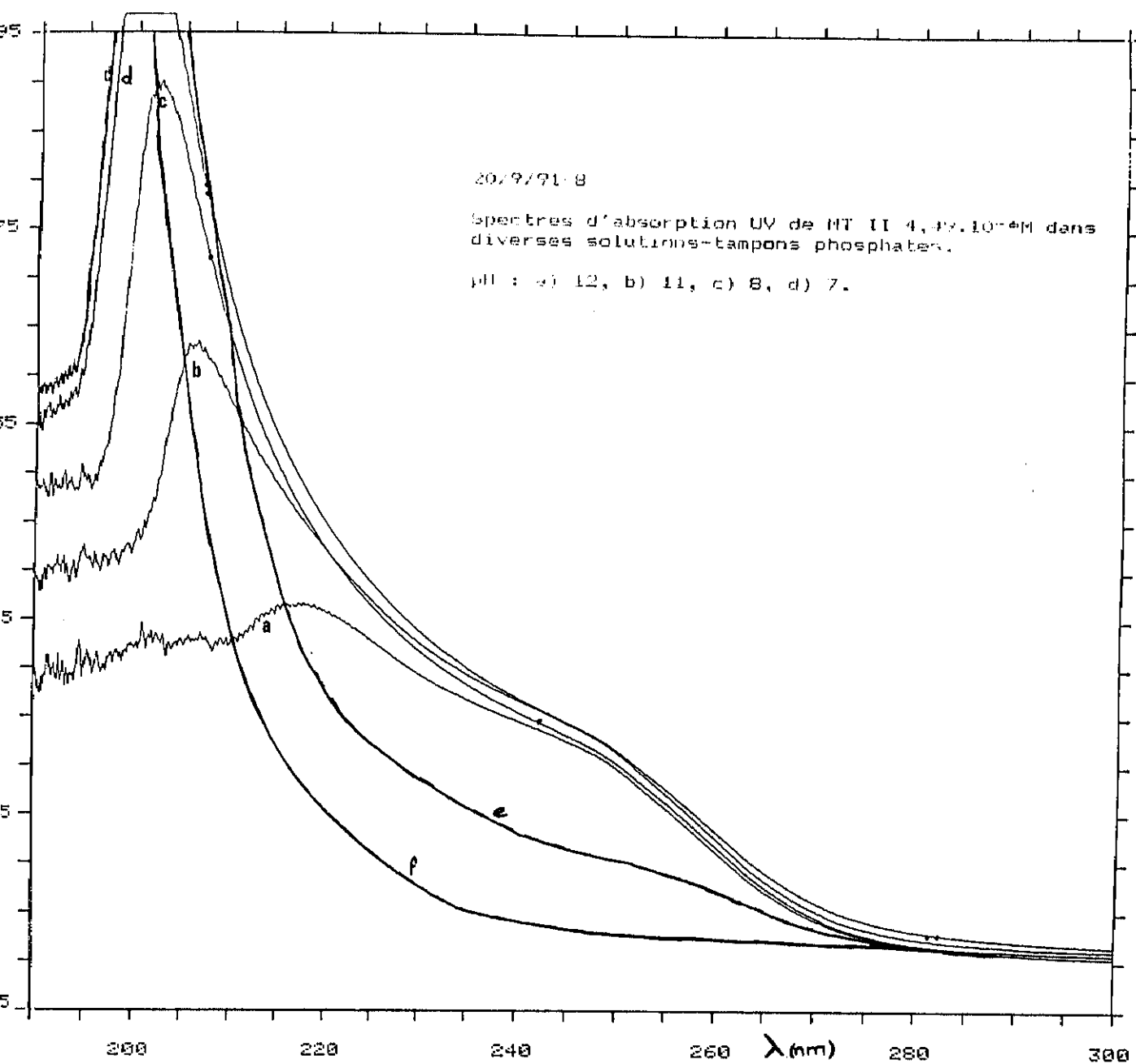


Fig. 58a. Espectros de absorción U.V. de una disolución $4,49 \cdot 10^{-5} M$ una de MT II r.l. en fosfato a diferentes pHs: a) 12, b) 11, c) 8, d) 7, e) 3.45 y f) 1.70

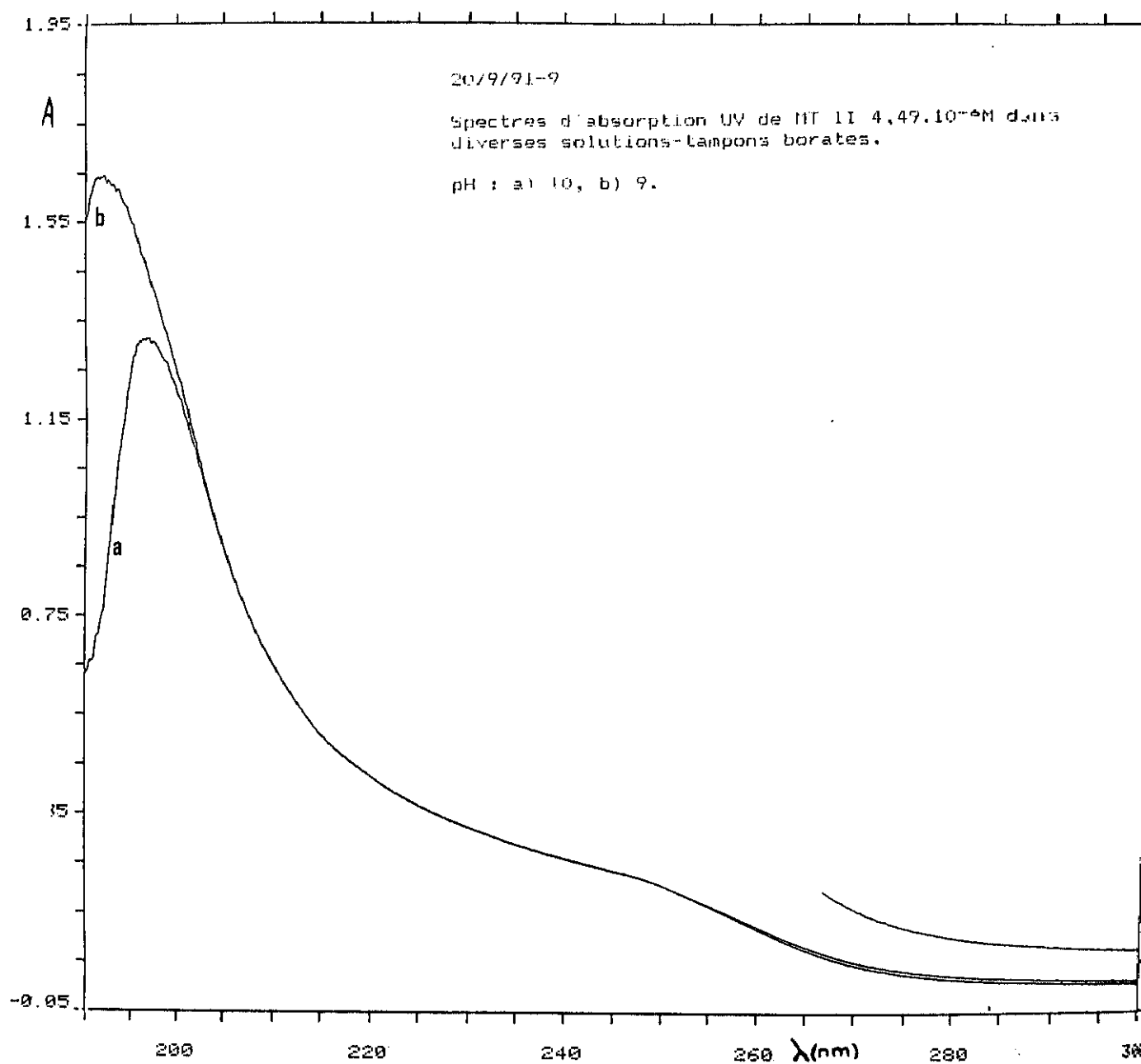


Fig. 58b. Espectros de absorción U.V. de una disolución $4,49 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ una de MT II r.l. en borato a diferentes pHs: a) 10 y b) 9

Absorbancia a 215, 220, 240 y 250 nm en función del pH

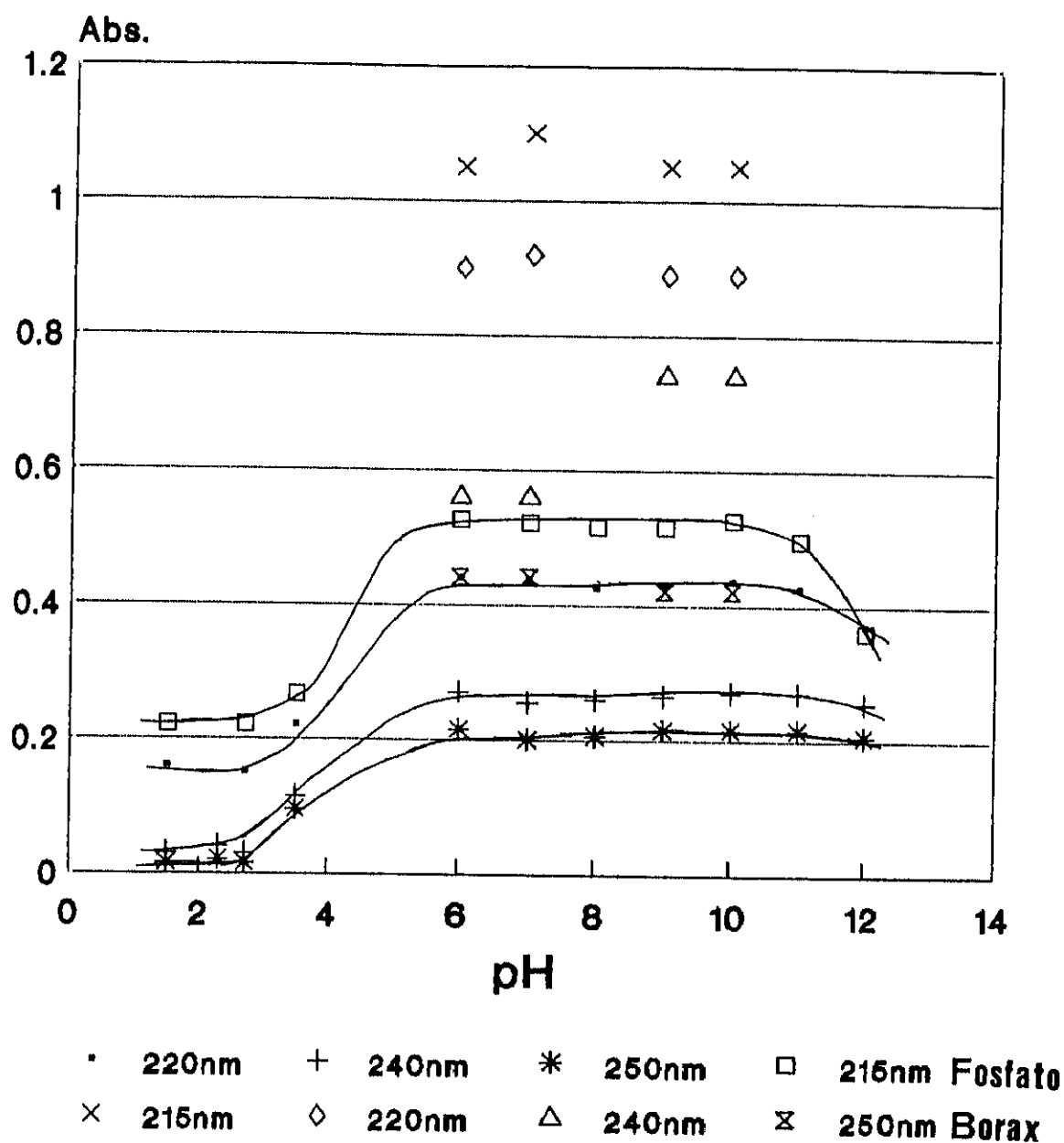


Fig. 59. Representación de la absorbancia a diferentes longitudes de onda de una disolución $4,49 \cdot 10^{-5}$ M de MT II r.l. en función del pH

Hemos de señalar que se han realizado dos lecturas en medio borato y que este medio exalta enormemente la señal.

d) Reversibilidad del equilibrio $M + T \rightleftharpoons MT$ en función del pH

La MT es una proteína con una estructura compleja, con una forma espacial adecuada para poder captar los cationes metálicos. Se sabe que cuando se disminuye el pH, estos cationes se liberan y la proteína se protona. Por lo tanto, pierde su estructura cuaternaria. La liberación de cationes a pH ácidos se ha comentado ampliamente en esta memoria. El objeto de este ensayo es conocer si el sistema $M + T \rightleftharpoons MT$ es reversible con el pH, es decir si la modificación del pH de ácido a alcalino produce una respuesta espectrofotométrica similar a la obtenida para una disolución preparada directamente en un medio alcalino.

Se ha utilizado una disolución $7.69 \cdot 10^{-6} M$ de la MT r.l. en TRIS $5.0 \cdot 10^{-2} M$ a pH que oscilaron entre 8.9 a 1.72. Los espectros obtenidos secuencialmente para la misma muestra a la que se añade HCl en muy pequeño volumen para hacer variar el pH pero no la concentración, se muestran en la figura 60. Se observa una evolución análoga a las descritas, el pico a 204 nm va desplazándose hacia longitudes de onda menores a la vez que aumenta la señal cuando el pH disminuye. Para $pH < 6.0$ el máximo de absorción se mantiene a una longitud de onda dada y la señal disminuye para pH más ácidos. El hombro, como cabe esperar, desaparece a estos pH.

Se ha realizado una experiencia análoga variando el pH en sentido inverso, es decir del pH más ácido que se alcanzó precedentemente hasta pH neutro, por adición de pequeños volúmenes de NaOH. En la figura 61 se representan los espectros secuenciales obtenidos para diferentes pH entre 1.7 y 7.45. En esa misma figura se incluye el espectro obtenido anteriormente

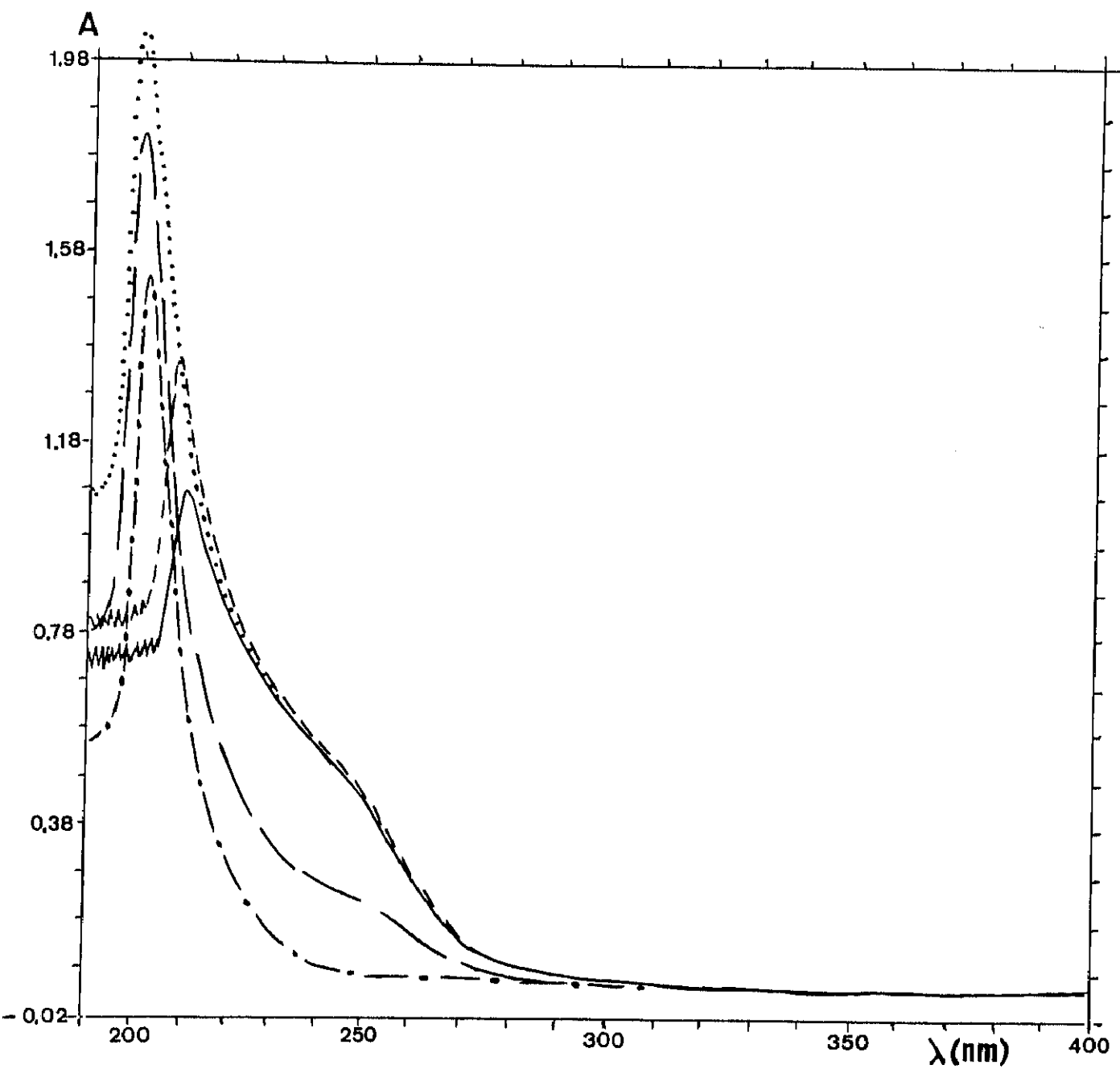


Fig. 60. Modificación del espectro de absorción U.V. de una disolución 7.69×10^{-5} M de MT r.l. en TRIS HCl 2.5×10^{-2} M a diferentes pHs: (—) 8.9, (---) 8.05, (.....) 6.08, (- - -) 3.2 y (- · -) 1.72.

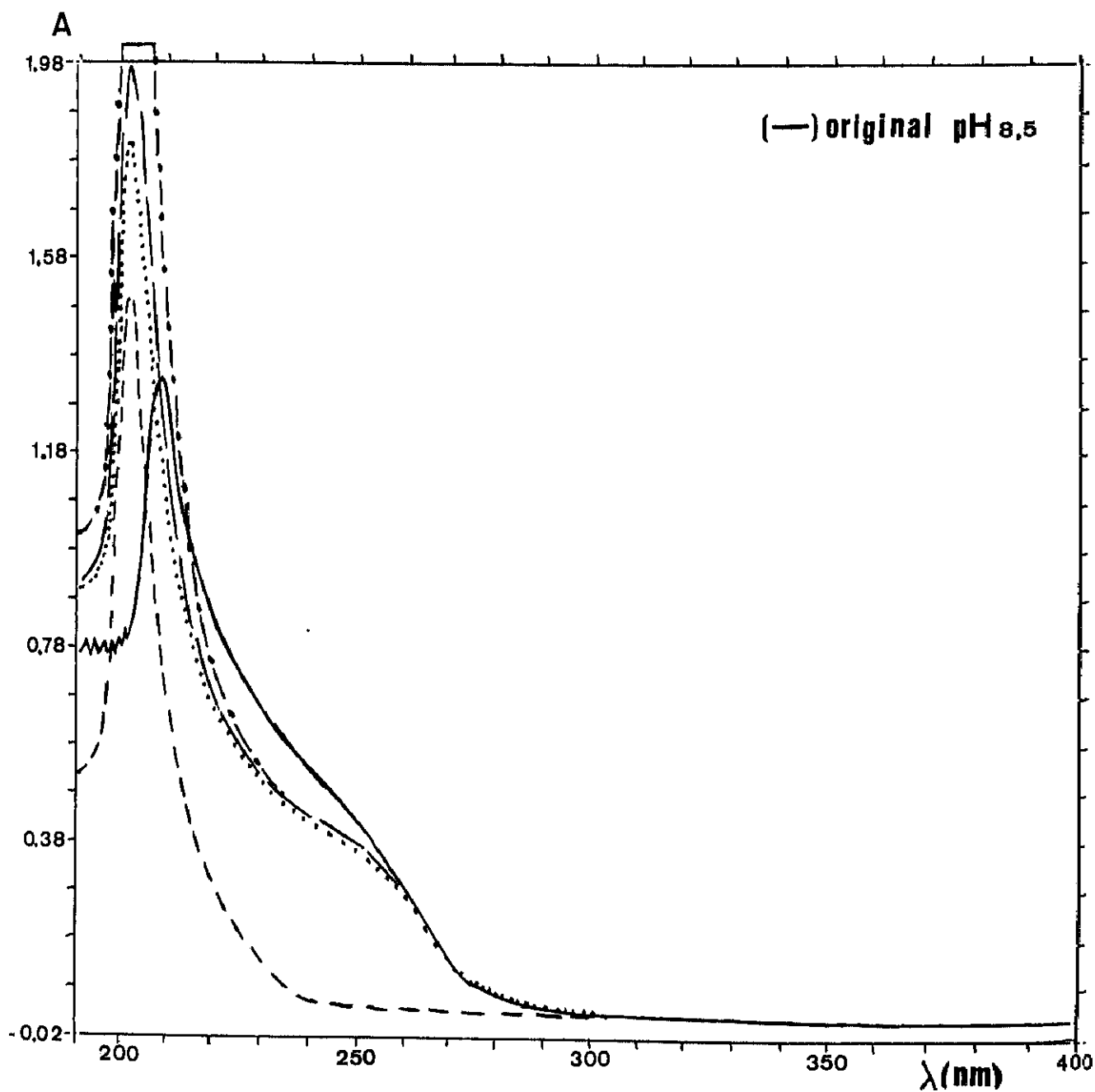
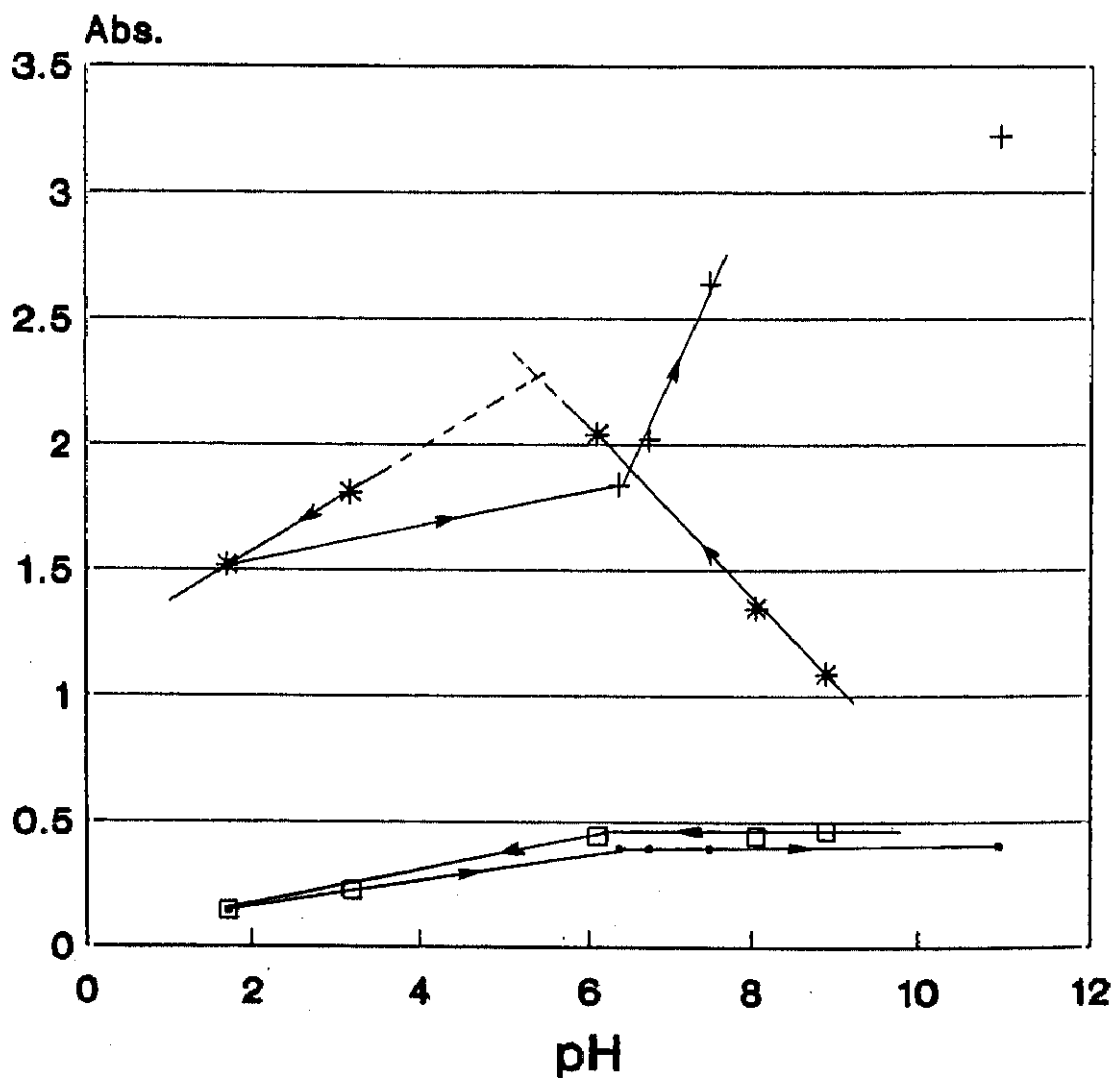


Fig. 61. Modificación del espectro de absorción U.V. de una disolución $7.69 \cdot 10^{-8}$ M de MT r.l. en TRIS HCl $2.5 \cdot 10^{-2}$ M al ir aumentando el pH con NaOH: (---) 1.72, (.....) 6.34, (—) 6.73 y (---) 7.47

(pH=8.05) de una disolución de MT disuelta en un medio dado, recientemente preparada, con el fin de comparar y observar las diferencias. Aunque no se haya llegado a pH muy alcalinos se puede indicar que, en este caso, el máximo del pico no se desplaza y aparece a una misma longitud de onda a todo el pH contrariamente a lo que sucedía cuando se iba de pH básicos a pH ácidos. Por otra parte, la señal en el máximo del pico aumenta. Con respecto al hombro atribuido al enlace metal-tiolato, la señal reaparece cuando se sobrepasa pH>6, pero la altura de la misma a una longitud de onda dada es menor a la correspondiente a la MT recientemente preparada. La evolución de la absorbancia, en el máximo del pico, así como en el hombro en función del pH que varía en uno u otro sentido se representa en la figura 62, lo que ilustra, de manera gráfica, lo descrito. En dicha figura se indica, con una flecha, el sentido de variación del pH.

De todo ello se puede indicar que probablemente el equilibrio $M + T \rightleftharpoons MT$ es reversible y que la apotioneína obtenida de la MT por cambio de pH a un pH ácido es capaz de "reconstituirse", es decir, fijar los cationes metálicos por sus grupos tiólicos cargados negativamente cuando el medio es alcalino, pero es probable que la estructura de la MT, en este último caso, no sea igual a la sintetizada "in vivo". El equilibrio entre los metales y la apotioneína que aparentemente se alcanza rápidamente "in vitro" origina una MT con una configuración espacial probablemente diferente de la sintetizada por órganos de animales en un proceso mucho más lento. Así mismo, como se indicará posteriormente cuando se presenten los resultados del estudio por métodos electroquímicos de análisis (cap. V), el cadmio forma dos complejos diferentes con la tioneína de diferente naturaleza, probablemente y, de diferente estabilidad. Es probable que el caso del zinc sea análogo, aunque no se hayan obtenido resultados concluyentes. Por ello la MT "reconstituida" cuando se pasa de pH ácidos a básicos puede tener diferente estructura y propiedades. Todas estas hipótesis se podrán confirmar, en un futuro, con el estudio polarográfico del comportamiento de la apotioneína, aislada a partir de la

Absorbancia en el máximo y a 250 nm en función del pH de la disolución de MT



• 250 nm á. → b. + máximo á. → b.
 * máximo b. → á. □ 250 nm b. → á.

Fig. 62. Representación de la absorbancia a 250 nm y en el máximo de una disolución $7.69 \cdot 10^{-6}$ M de MT r.l. en TRIS HCl $2.5 \cdot 10^{-2}$ M en función de la modificación del pH efectuada

metalotioneína, en presencia de cationes metálicos cadmio y/o zinc.

IV.C.4.D. ADICIONES PATRON

Con el objeto de observar las modificaciones en espectrofotometría del perfil $A=f(\lambda)$ de la MT en presencia de diferentes compuestos se han realizado diferentes ensayos cualitativos de adiciones patrón, tanto de un compuesto orgánico, cisteína que está contenido en la MT, como de cationes metálicos, cadmio como catión común a la $(Cd,Zn)T$ y platino como catión no común.

a) Adiciones patrón de cisteína

Los espectros de la MT sola y en presencia de cantidades crecientes de cisteína se representan en la figura 63. En ella se observa un claro aumento de la señal a unos 200 nm como consecuencia de la aportación de grupos funcionales contenidos en la tioneína que presentan propiedades de absorción a esa misma longitud de onda (figura 11 curvas 2 y 3). Además, se observa la aparición de un hombro a unos 235 nm que es característica de la cisteína en presencia de TRIS debido, probablemente, a la interacción cisteína-TRIS. En ese intervalo de longitudes de onda existe una superposición de las señales de absorbancia debida a los dos compuestos, por lo que no se puede indicar si existe un desplazamiento de los cationes metálicos ligados inicialmente a la MT para asociarse como metal-cisteína con constantes de asociación mas grandes (310).

b) Adiciones patrón de $CdCl_2$

A una disolución de MT se adiciona Cd^{2+} hasta una concentración cinco veces mayor que la concentración inicial de

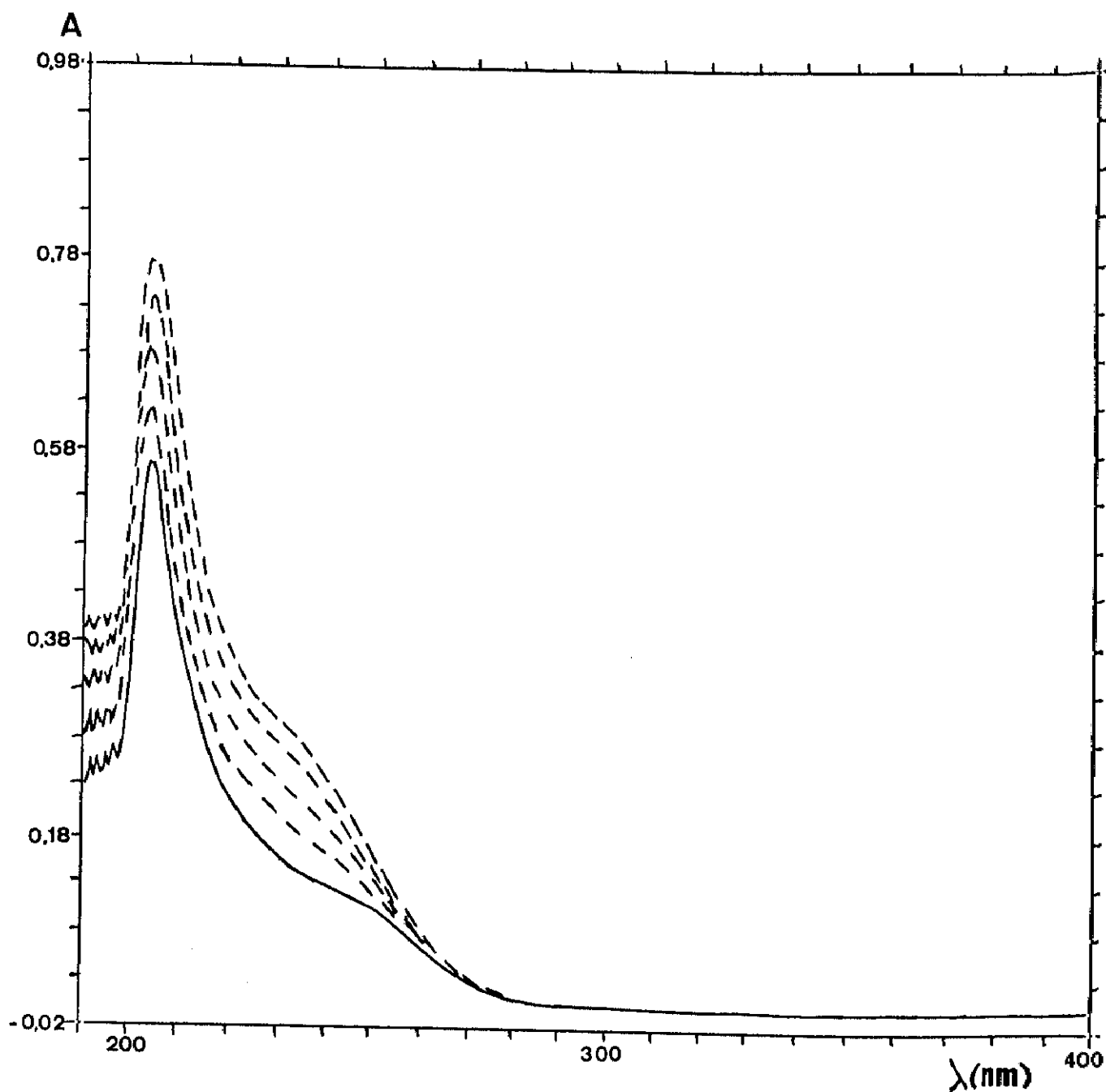


Fig. 63. Modificación del espectro de absorción U.V. de una disolución $7.69 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ de MT r.l. en TRIS HCl $2.5 \cdot 10^{-2} \text{ M}$ (pH 7.5) en función de las sucesivas adiciones de cisteína.

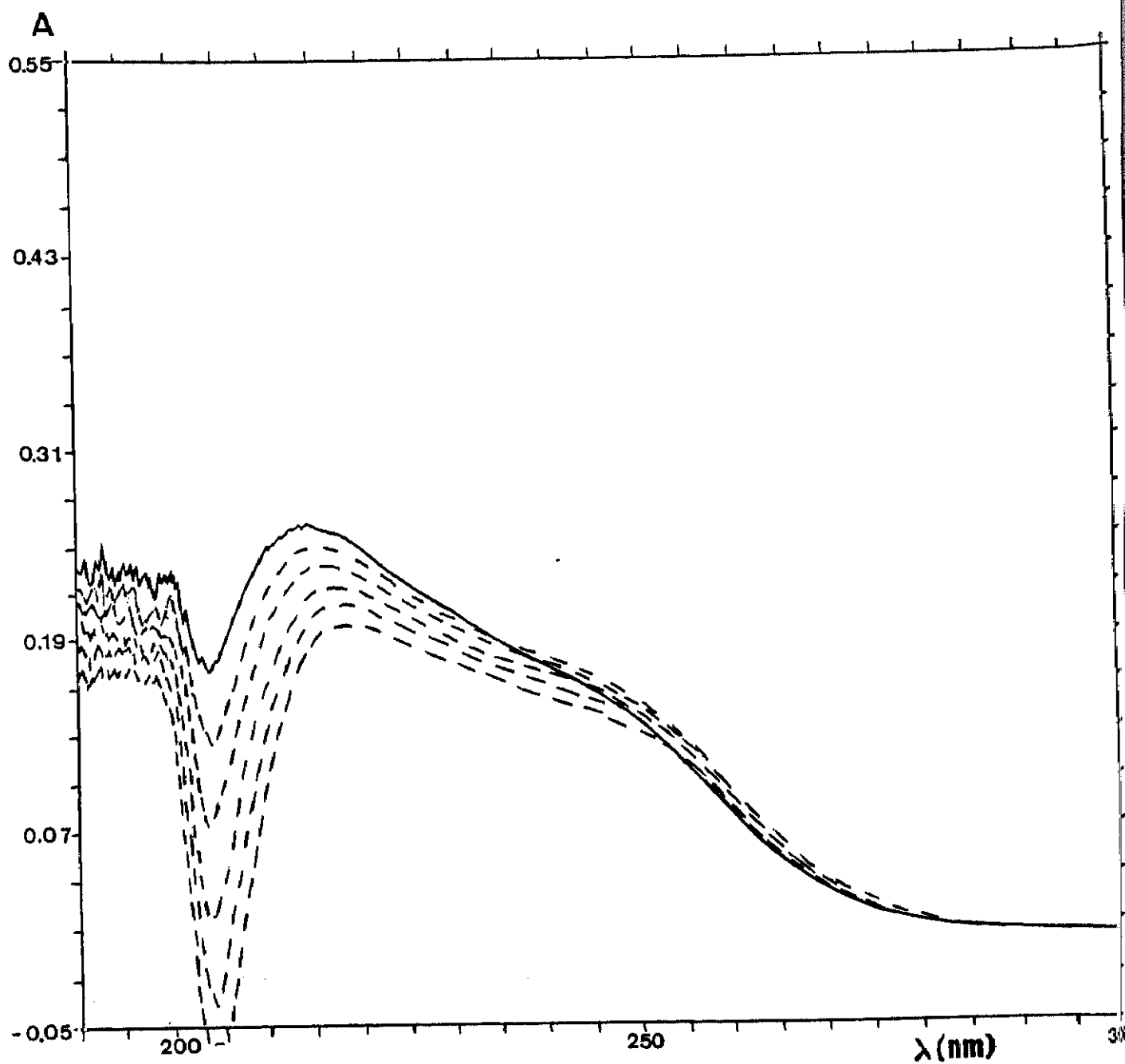
MT. Los perfiles del hombro atribuidos al enlace metal-tiolato se modifican ligeramente, como puede verse en la figura 64, el hombro se desplaza ligeramente hacia longitudes de onda mayores.

Las longitudes de onda de absorción de los complejos Cd-T y Zn-T obtenidos por varios autores (12,19,24,45,72,80,83,84,95,102,112,117,132,134) son 250nm y 235nm, respectivamente. La señal de absorbancia en función de la relación existente de concentraciones, $Cd_{añadido}/MT$, se representa en la figura 65. En ella puede observarse que la señal aumenta en el hombro de absorción a medida que se suceden las adiciones de cadmio, hasta que $Cd_{añadido}/MT$ es aproximadamente igual a 3, entonces la señal se estabiliza. Se deduce que existe una interacción entre el cadmio que se adiciona a la disolución y la metalotioneína. Sin embargo, el método espectrofotométrico no permite diferenciar las señales de absorbancia debidas a los diferentes compuestos presentes en disolución.

c) Adiciones patrón de platino

Se ha realizado un ensayo puntual, no sistemático, del comportamiento de la MT tras la adición de una sal de platino, $H_2(PtCl_6) \cdot 6H_2O$. Como ya se indicó anteriormente en la primera parte de la memoria, el platino es un catión con una elevada afinidad por la MT, capaz de desplazar tanto al cadmio como al zinc.

Los espectros obtenidos se muestran en la figura 66. Se observa que el perfil se modifica y que probablemente existe una interacción entre el platino y la tioneína que ha provocado la aparición de un hombro, perfectamente definido a 240 nm y atribuible probablemente a los enlaces platino-tiol.



.Fig. 64 Modificación del espectro de absorción U.V. de una disolución $2.5 \cdot 10^{-3}$ M de MT II r.l. en TRIS HCl $2.5 \cdot 10^{-2}$ M (pH 7.5) en función de las sucesivas adiciones de cadmio.

Absorbancia en el hombro de absorción en función del cadmio añadido

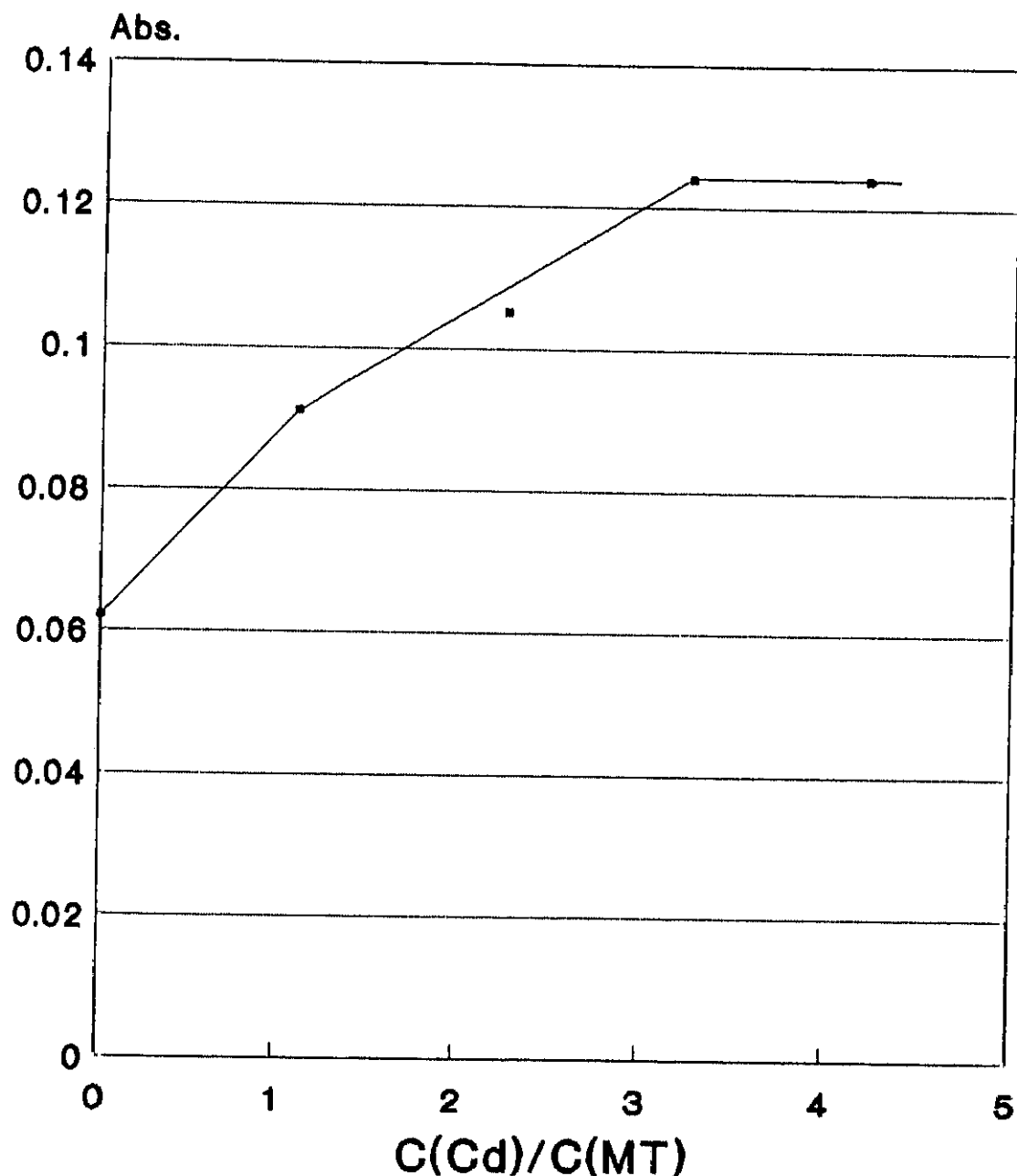


Fig. 65. Absorbancia a 250 nm de una disolución $2.5 \cdot 10^{-8}$ M de MT II r.l. en TRIS HCl $2.5 \cdot 10^{-2}$ M (pH 7.5) en función de las sucesivas adiciones de cadmio.

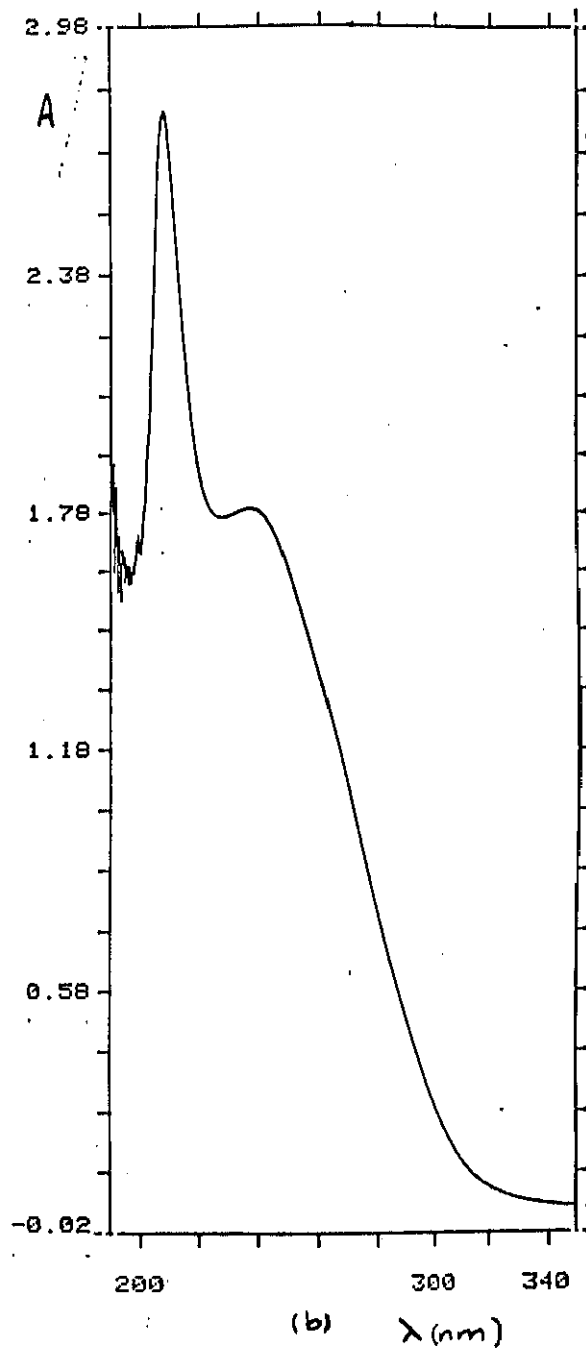
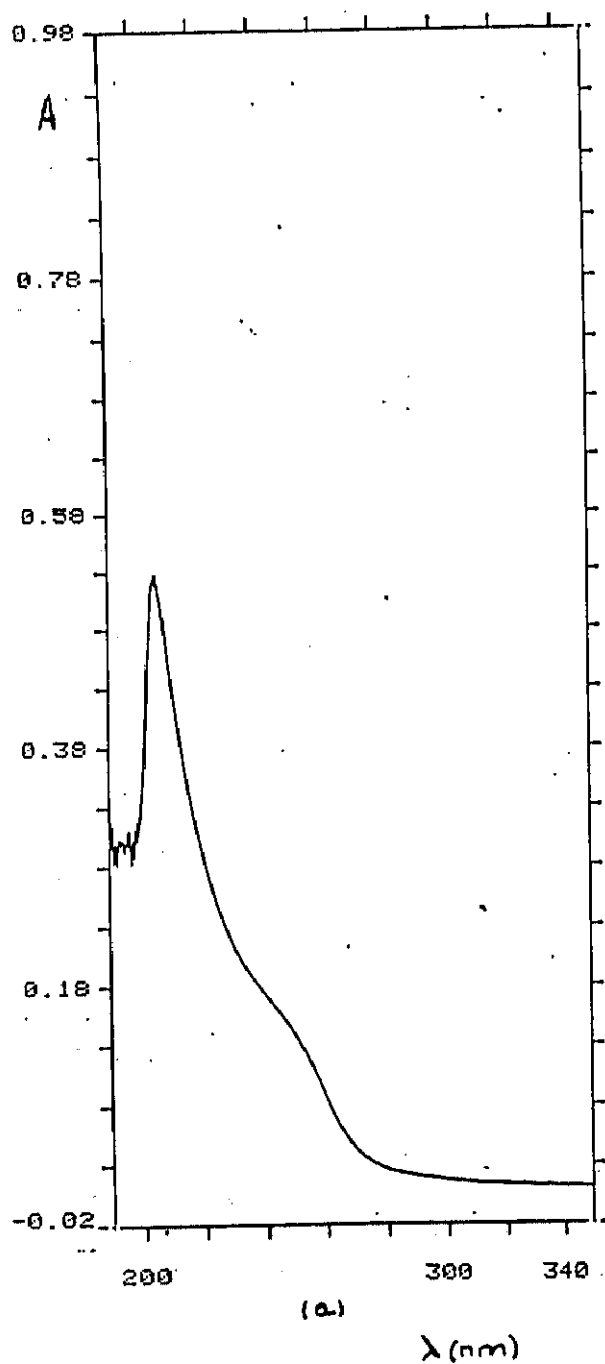


Fig. 66. Efecto de la adición de una sal de platino sobre una disolución de MT r.l. en TRIS HCl $2.5 \cdot 10^{-2}M$ a pH 7.5
a) MT y b) MT + Pt

IV.C.4.E. ABSORBANCIA EN FUNCION DE LA CONCENTRACION PARA LAS CINCO MT COMERCIALIZADAS

Se ha realizado un estudio espectrofotométrico de las MT utilizadas procedentes de diferente origen, "rabbit liver" o "horse kidney", en función de la concentración, estudio análogo al que se realizó con la cisteína y el fragmento. Al igual que con estos otros dos compuestos, en el caso de la MT se pretendía comprobar que cumplen la ley de Lambert-Beer y, por tanto, a partir de la medida de la absorbancia poder calcular la concentración. Es decir, utilizar la espectrofotometría de absorción molecular U.V. como método analítico cuantitativo para las MT independientemente de cuál es su origen.

Por otra parte, se ha medido la absorbancia de una de las metalotioneínas, la MT r.l. en función de la concentración para diferentes condiciones experimentales, diferentes medios y pH con el fin de comparar los coeficientes de absorción molar obtenidos y sus variaciones con los parámetros que se han modificado. De ello se puede seleccionar un medio dado para realizar el estudio con las cinco MT. Estos ensayos preliminares se presentan en primer lugar.

a) $A=f(c)$ para la MT r.l. Influencia del medio.

En estos ensayos preliminares se han utilizado dos tipos diferentes de metalotioneínas de la misma procedencia pero que contienen diferentes isoformas, la mezcla de las dos isoformas MT I+II "rabbit liver" o bien la segunda MT II "rabbit liver". Se han hecho variar diferentes parámetros en disolución, la naturaleza del tampón empleado, TRIS o fosfato, el primero a diferentes concentraciones. La mayor parte de los ensayos se han realizado a pH=7.5, pH que es el usual en la mayor parte de las experiencias que se describen en esta memoria y se ha comparado con los resultados obtenidos a un pH 9.0.

Algunos de los espectros se muestran en las figuras 67 y 68. En todos los casos se han obtenido variaciones lineales de la representación absorbancia en función de la concentración de producto, $A=f(c)$, para el intervalo de concentraciones estudiado y para diferentes longitudes de onda a las que se ha medido la absorbancia. En las figuras 69 y 70 se representan algunas de las rectas obtenidas para unas condiciones experimentales dadas.

En la tabla se resumen las características más importantes del conjunto de los ensayos realizados. En ella se indican los valores de los coeficientes de absorción molar, ξ , obtenidos para cada caso. Se han determinado a dos longitudes de onda características, la que corresponde al máximo del pico de absorción atribuido a la parte orgánica de la molécula y una longitud de onda en el hombro que se ha asignado como característica de la absorción metal-tiolato. Entre paréntesis se indica la longitud de onda a la que se ha calculado el coeficiente de absorción molar, ξ . La longitud de onda, λ_{hombro} , del hombro es similar para todos los medios estudiados; sin embargo, la longitud de onda del máximo del pico depende del medio utilizado.

La influencia del medio, en las diferentes condiciones experimentales estudiadas, se manifiesta en la variación del coeficiente de absorción molar correspondiente al máximo, ξ_{max} , mucho más que en el hombro. En efecto, para este último se puede señalar que el valor del coeficiente de absorción molar, ξ , es muy próximo para todos los medios y parámetros utilizados, lo que se podía esperar ya que la absorbancia debida a los enlaces catión-tiolato está poco influida por los cambios. En particular, la variación del pH, en un intervalo tan pequeño, no es suficiente para modificar la naturaleza y propiedades del enlace metal-tioneína. Por otra parte, también el valor del coeficiente de absorción molar es dependiente de la procedencia de la metalotioneína empleada y, a esa longitud de onda, no depende del contenido metálico inicial en la muestra, ni de la proporción

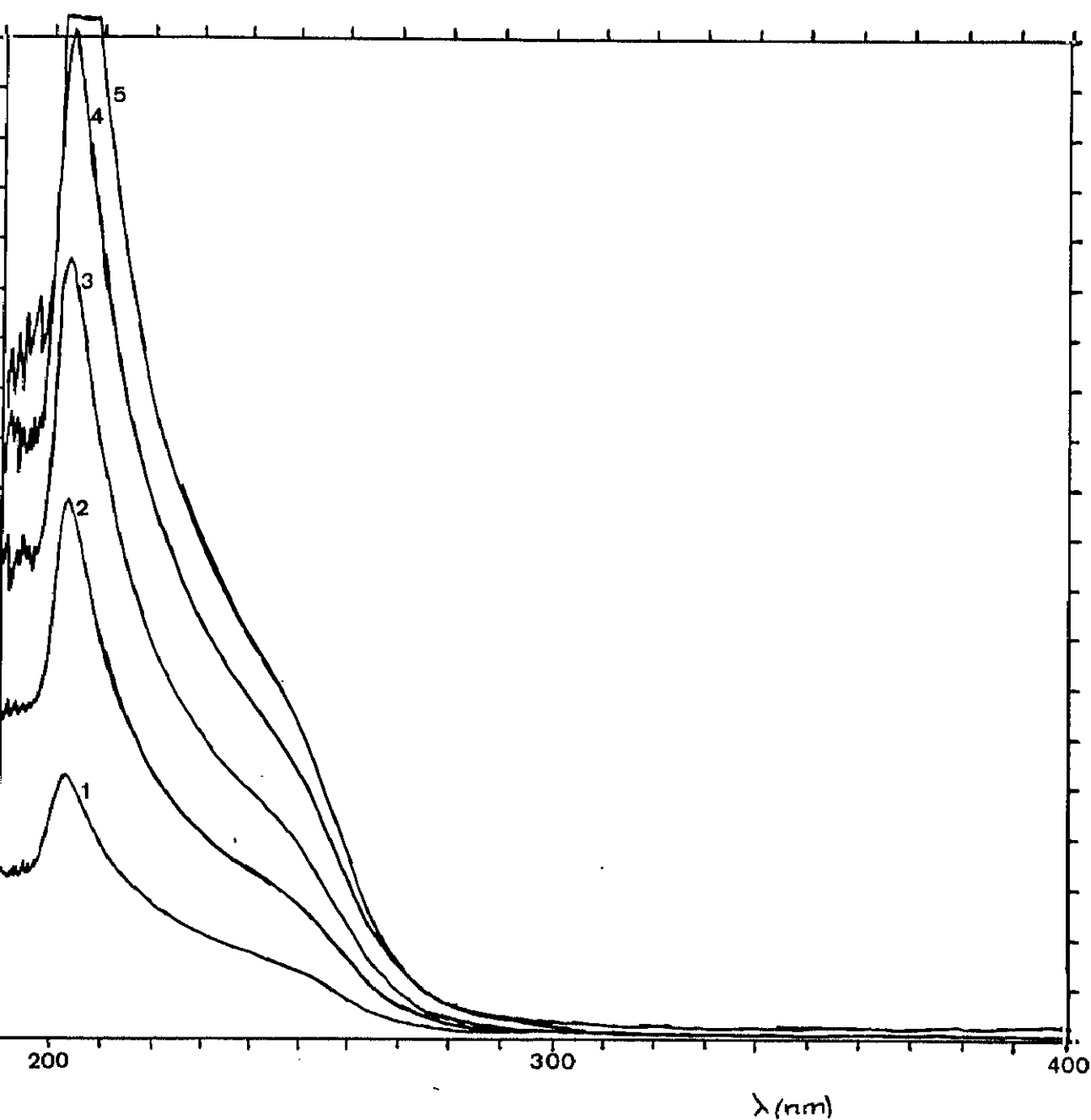


Fig. 67a. Espectros U.V. de diferentes concentraciones de MT r.l. en TRIS HCl $2.5 \cdot 10^{-2} \text{ M}$ a pH 7.5: 1) $3.08 \cdot 10^{-8} \text{ M}$, 2) $6.06 \cdot 10^{-8} \text{ M}$, 3) $8.94 \cdot 10^{-8} \text{ M}$, 4) $1.17 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ y 5) $1.45 \cdot 10^{-7} \text{ M}$

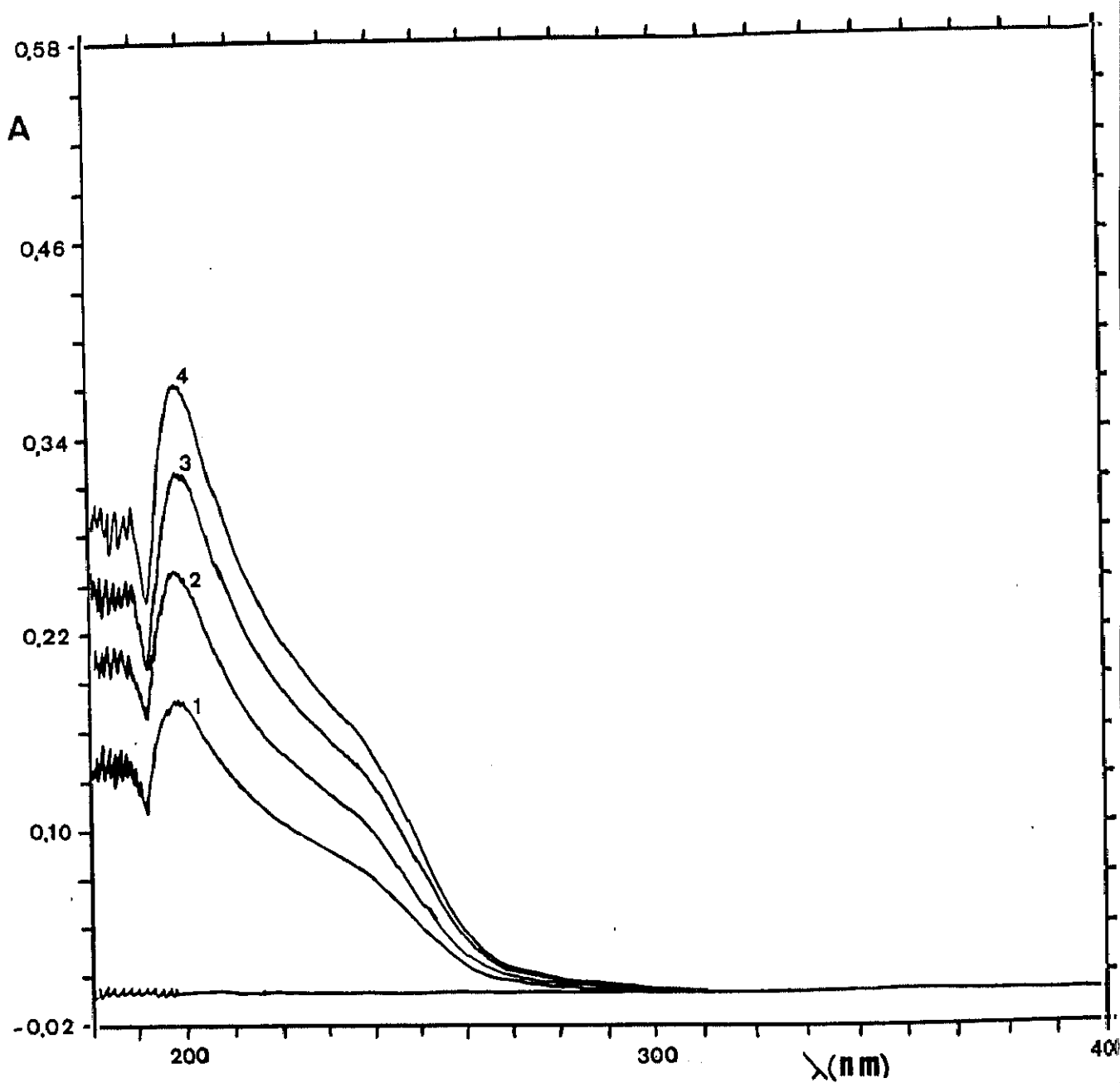


Fig. 67b. Espectros U.V. de diferentes concentraciones de MT r.l. en tampón fosfato 0.1 M a pH 6.78: 1) $1.51 \cdot 10^{-8}$ M, 2) $2.08 \cdot 10^{-8}$ M, 3) $2.56 \cdot 10^{-8}$ M y 4) $2.975 \cdot 10^{-8}$ M

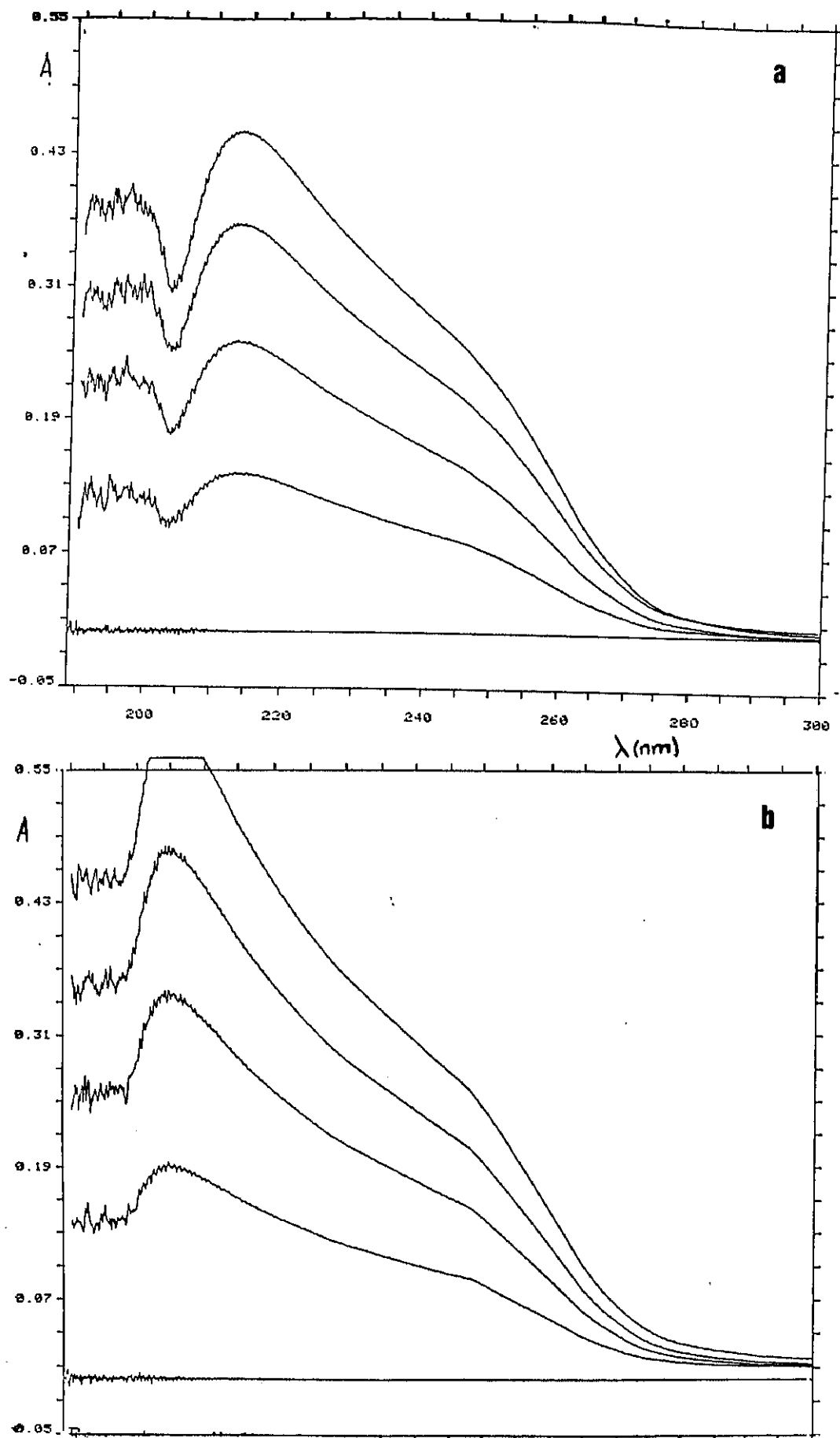
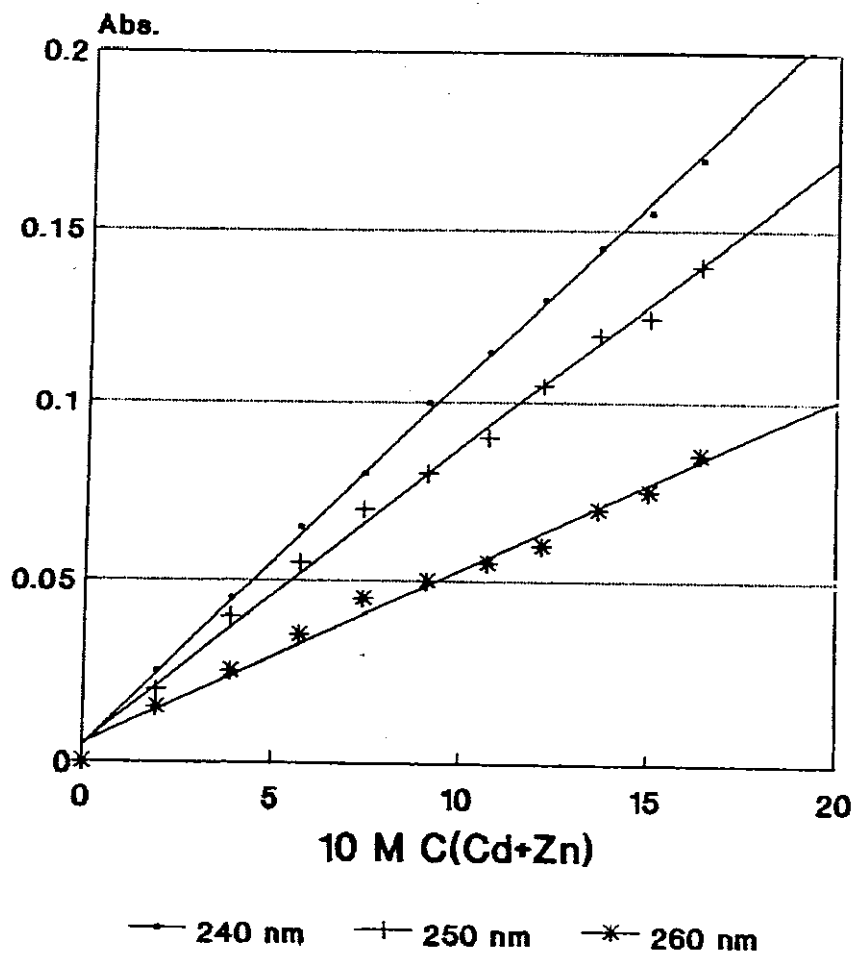
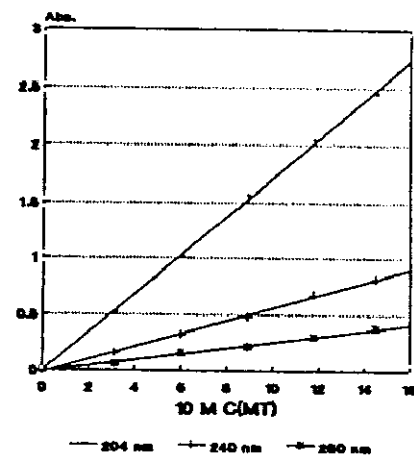


Fig. 68. Espectros U.V. de varias concentraciones de MT r.l. en dos medios diferentes: a) TRIS 5.0 10⁻²M y b) TRIS 2.5 10⁻²M

Absorbancia de MT r.l. en función de la concentración de Cadmio+Zinc



Absorbancia de MT r.l. en función de la concentración de apoT



Absorbancia de MT r.l. en función de la concentración de apoT

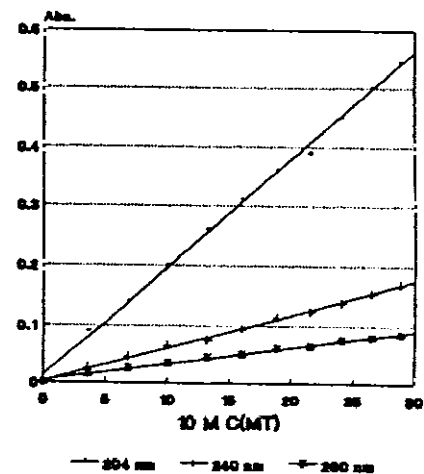
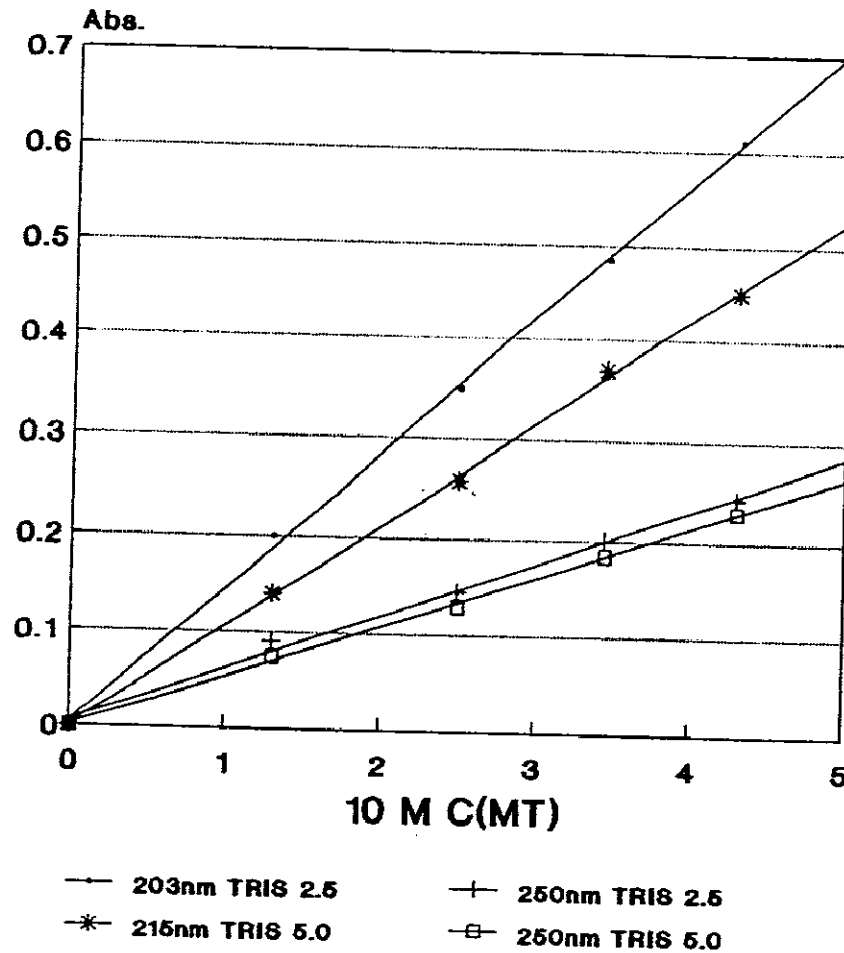
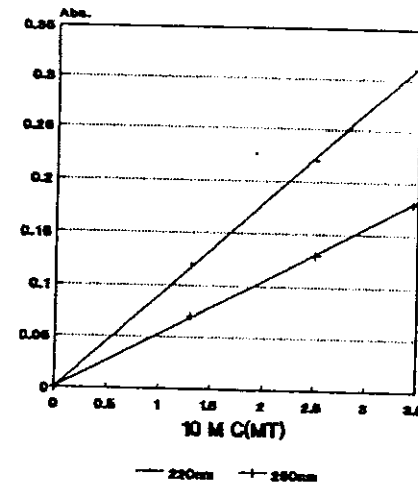


Fig. 69. $A=f(c)$ de la MT r.l. en función del contenido total de MT y de cadmio+zinc para tres longitudes de onda: 240, 250 y 260 nm.

$A=f(C)$ de MT-II r.l. en TRIS a dos conc.
0.025 y 0.05 M. y pH 7.5



$A=f(C)$ de MT-II r.l. en TRIS a pH 9.0



$A=f(C)$ de MT-II r.l. en fosfato

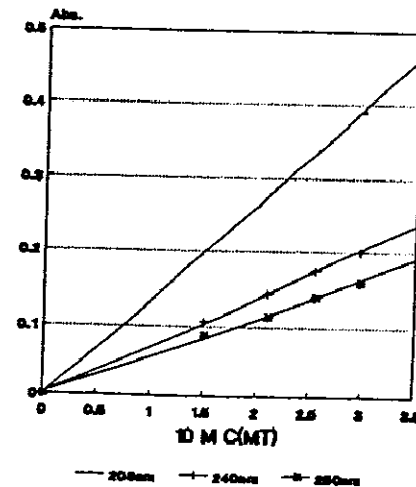


Fig. 70. $A=f(c)$ de la MT II r.l. en función de la concentración a diferentes longitudes de onda en diferentes condiciones.

entre las cantidades de cadmio y zinc presentes, diferentes para las dos metalotioneínas.

A partir de los valores obtenidos se ha seleccionado el TRIS, como medio idóneo para estudiar las cinco MT, en las siguientes condiciones $2.5 \cdot 10^{-2}M$ y pH 7.5. Hay que indicar que sería preferible emplear el fosfato, pero escogemos el TRIS porque es el medio en el que se ha realizado la mayor parte del trabajo que constituye esta memoria.

Tabla 21. Coeficientes de absorción molar a dos longitudes de onda, en el máximo y en el hombro de absorción, para varias disoluciones de MT en diferentes medios.

METALO-TIONEINA	M E D I O	INTERVALO CONCENTRACION	$\lambda_{max.}$	λ_{hombro}
MT I+II r.l.	TRIS $2.5 \cdot 10^{-2}M$ pH = 7.5	$3.5 \cdot 10^{-7} -$ $2.89 \cdot 10^{-6}M$	$1.79 \cdot 10^5$ ($\lambda=204$)	$5.62 \cdot 10^4$ ($\lambda=240$) $4.53 \cdot 10^4$ ($\lambda=250$)
	Fosfato 0.1M pH = 6.78	$1.51 \cdot 10^{-7} -$ $3.0 \cdot 10^{-6}M$	$1.30 \cdot 10^5$ ($\lambda=208$)	$4.9 \cdot 10^4$ ($\lambda=250$)
MT II r1	TRIS $2.5 \cdot 10^{-2}M$ pH = 7.5	$1.36 \cdot 10^{-7} -$ $4.29 \cdot 10^{-6}M$	$1.40 \cdot 10^5$ ($\lambda=208$)	$5.34 \cdot 10^4$ ($\lambda=250$)
	TRIS $5.0 \cdot 10^{-2}M$ pH = 7.5	$1.36 \cdot 10^{-7} -$ $4.29 \cdot 10^{-6}M$	$1.10 \cdot 10^5$ ($\lambda=208$)	$5.35 \cdot 10^4$ ($\lambda=250$)
	TRIS $5.0 \cdot 10^{-2}M$ pH = 9.0	$1.36 \cdot 10^{-7} -$ $3.46 \cdot 10^{-6}M$	$9.03 \cdot 10^4$ ($\lambda=220$)	$5.35 \cdot 10^4$ ($\lambda=250$)

b) Absorbancia en función de la concentración para las cinco metalotioneínas

Se prepararon varias disoluciones de las cinco MT a diferentes concentraciones que oscilaron entre $7.0 \cdot 10^{-7}$ y $1.72 \cdot 10^{-6} M$ en TRIS $2.5 \cdot 10^{-2} M$ y pH 7.5. Los espectros obtenidos se muestran en las figuras 71-72. En todos los casos se observó una relación lineal entre la absorbancia y la concentración. Se representan las rectas $A=f(c)$ para diferentes longnitudes de onda de cada una de las cinco metalotioneínas (fig. 73-80). Para comparar y sacar conclusiones se representan las absorbancias a cuatro longitudes de onda en función de la concentración expresada en diferentes maneras, concentración total de producto, concentración molar total de cationes y concentración molar de cadmio o zinc.

A partir de las rectas obtenidas se calculan los valores de ξ en cada caso. Los valores obtenidos se indican en la siguiente tabla 22.

Tabla 22. Coeficiente de absorción molar para las cinco MT para cuatro longitudes de onda en función de la concentración total de metales y del contenido de MT, todas representadas en molar.

NUESTRA	ξ (204/MT)	ξ (204/Cd+Zn)	ξ (240/Cd+Zn)	ξ (250/Cd+Zn)	ξ (260/Cd+Zn)
MT h.k. 79F9670	$3.38 \cdot 10^5$	$7.91 \cdot 10^4$	$1.33 \cdot 10^4$	$1.05 \cdot 10^4$	$7.83 \cdot 10^3$
MT h.k. 28F9545	$3.22 \cdot 10^5$	$1.09 \cdot 10^5$	$1.63 \cdot 10^4$	$1.18 \cdot 10^4$	$9.10 \cdot 10^3$
MT r.l. 20H9650	$2.90 \cdot 10^5$	$4.69 \cdot 10^4$	$1.13 \cdot 10^4$	$0.83 \cdot 10^4$	$5.01 \cdot 10^3$
MT-I r.l 129F9575	$3.18 \cdot 10^5$	$6.60 \cdot 10^4$	$1.29 \cdot 10^4$	$1.02 \cdot 10^4$	$7.00 \cdot 10^3$
MT-II r.l 79F9510	$3.37 \cdot 10^5$	$6.45 \cdot 10^4$	$1.15 \cdot 10^4$	$1.19 \cdot 10^4$	$7.73 \cdot 10^3$

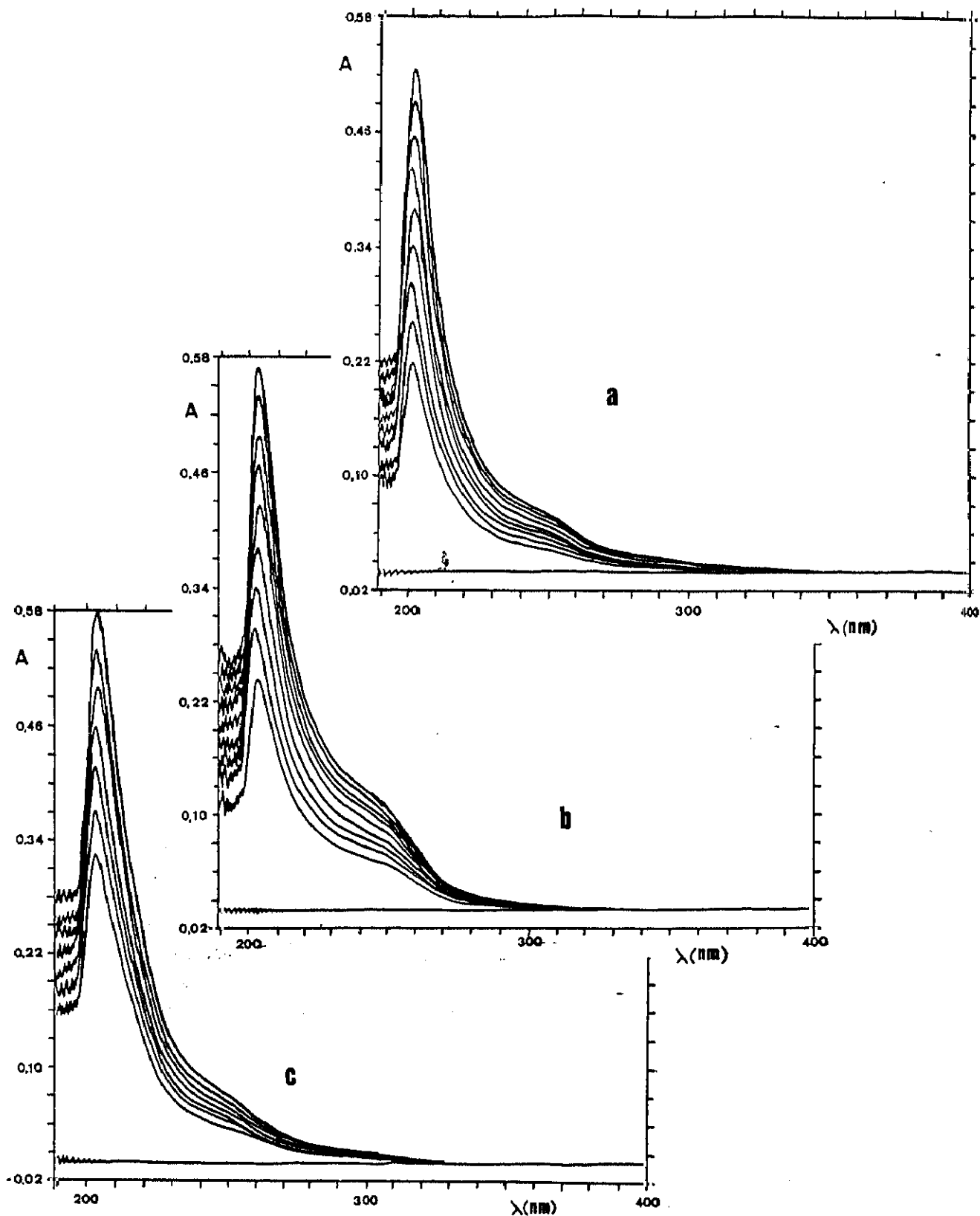


Fig. 71. Absorbancia de: (a) la MT (I+II) "horse kidney" 28F9545 y (b) MT II "rabbit liver" y (c) MT "horse kidney" 79F9670 en función de la concentración.

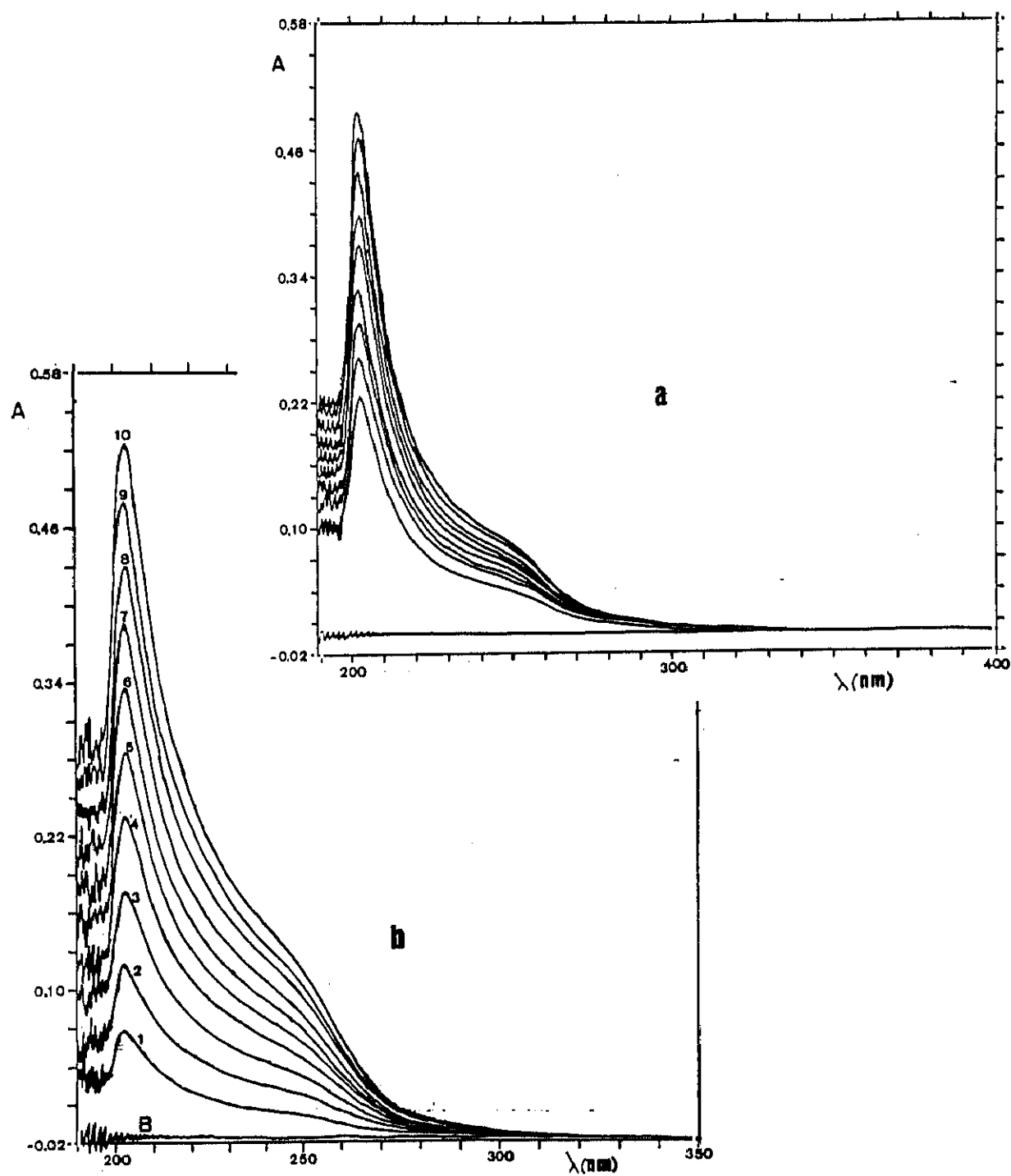


Fig. 72. Absorbancia de: (a) la MT (I+II) "rabbit liver" y (b) MT I "rabbit liver" en función de la concentración.

Absorbancia a 204 nm en función de la concentración para las cinco MT

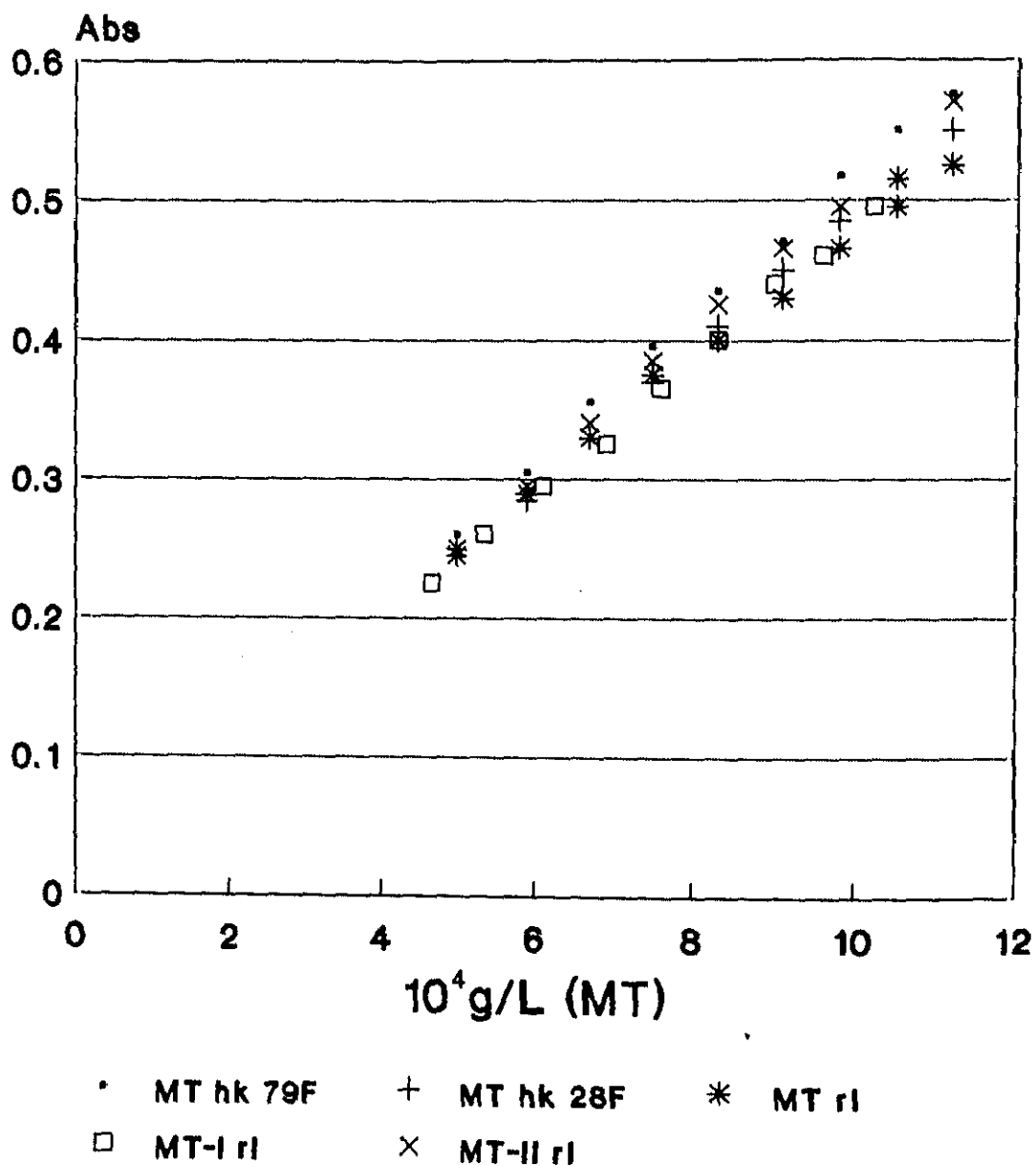


Fig. 73. Representación de la absorbancia a 204 nm en función de la concentración de MT (g/L) para las cinco MT comercializadas.

Absorbancia a 205 nm en función de la concentración para las cinco MT

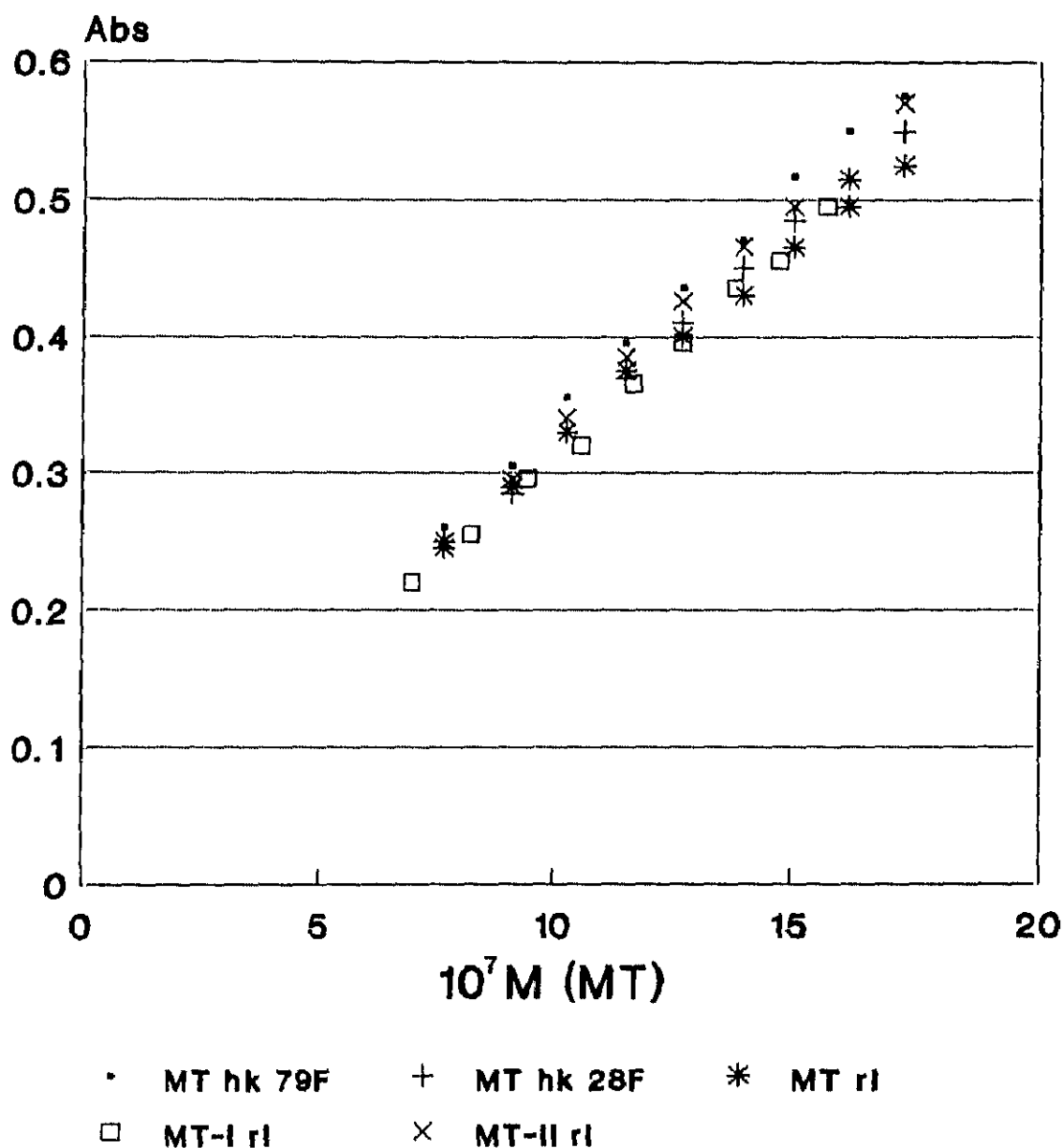


Fig. 74. Representación de la absorbancia a 204 nm en función de la concentración molar de MT para las cinco MT comercializadas.

Absorbancia a 204 nm en función de la concentración de Cadmio+Zinc

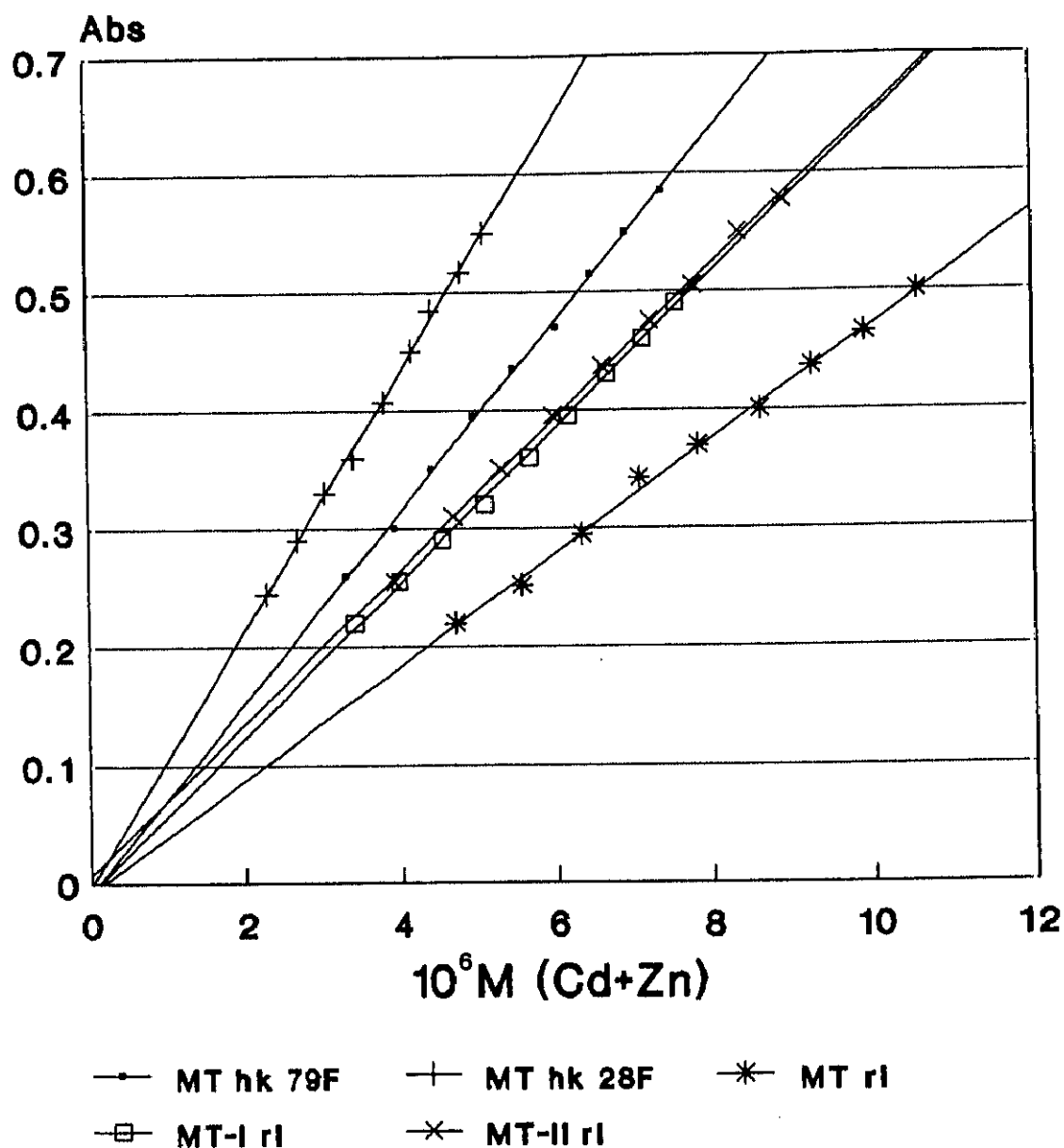


Fig. 75. Representación de la absorbancia a 204 nm en función del contenido total de Cadmio+zinc para las cinco MT comercializadas.

Absorbancia a 250 nm en función de la concentración de Cadmio+Zinc

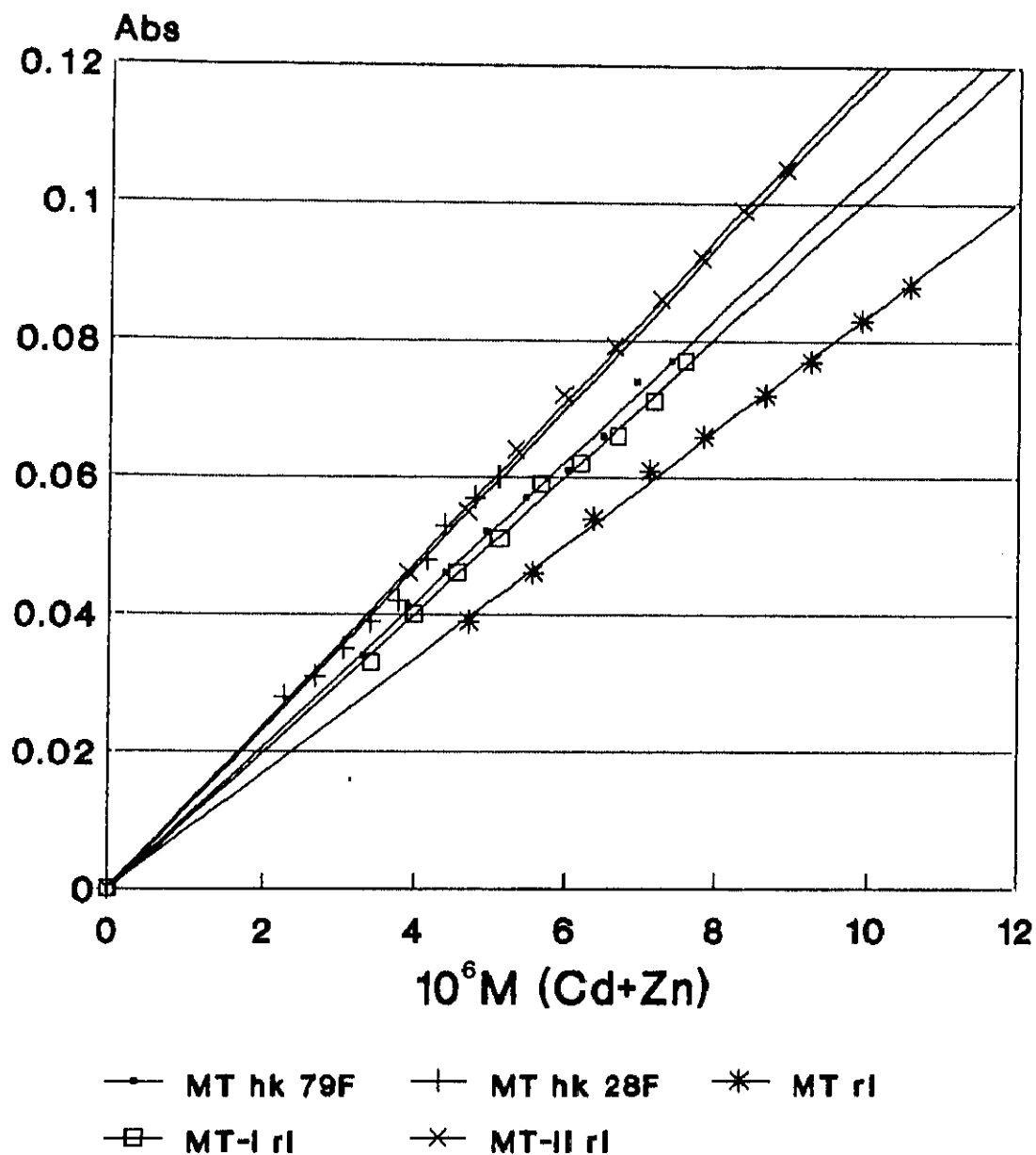


Fig. 76. Representación de la absorbancia a 250 nm en función del contenido total de Cadmio+zinc para las cinco MT comercializadas.

Absorbancia a 240 nm en función de la concentración de Cadmio+Zinc

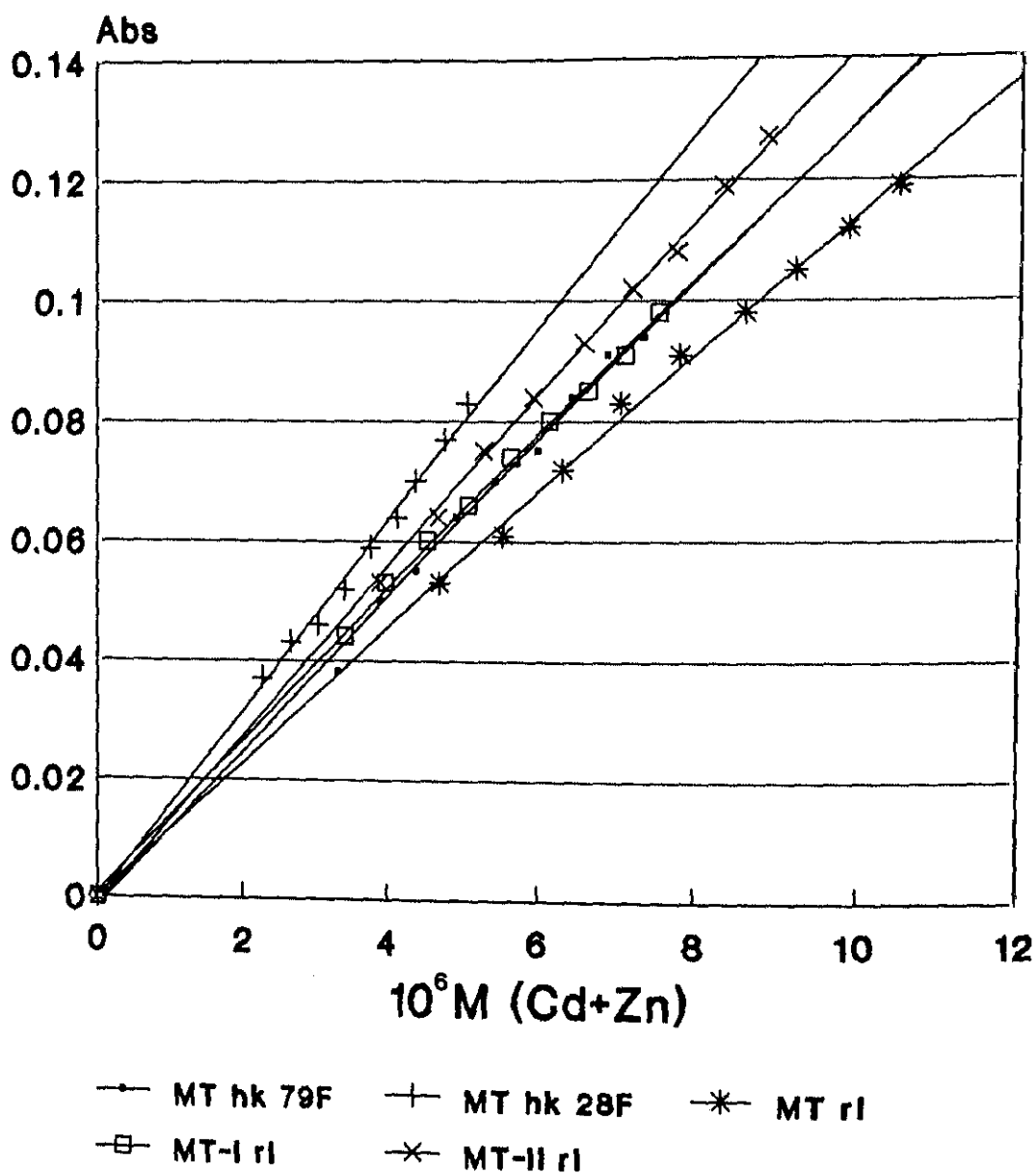


Fig. 77. Representación de la absorbancia a 240 nm en función del contenido total de Cadmio+zinc para las cinco MT comercializadas.

Absorbancia a 260 nm en función de la concentración de Cadmio+Zinc

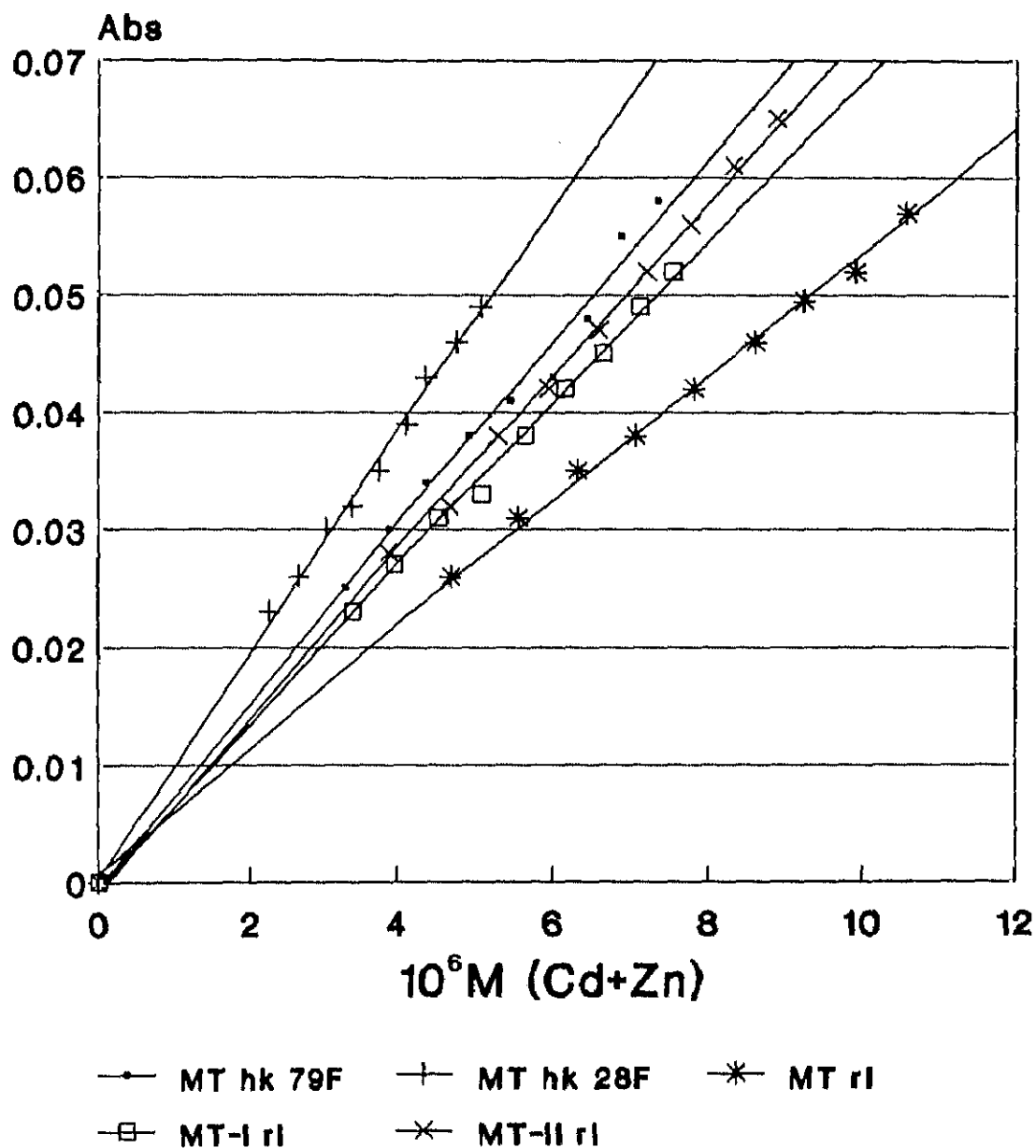


Fig. 78. Representación de la absorbancia a 260 nm en función del contenido total de Cadmio+zinc para las cinco MT comercializadas.

Absorbancia a 250 nm en función de la concentración de Cadmio

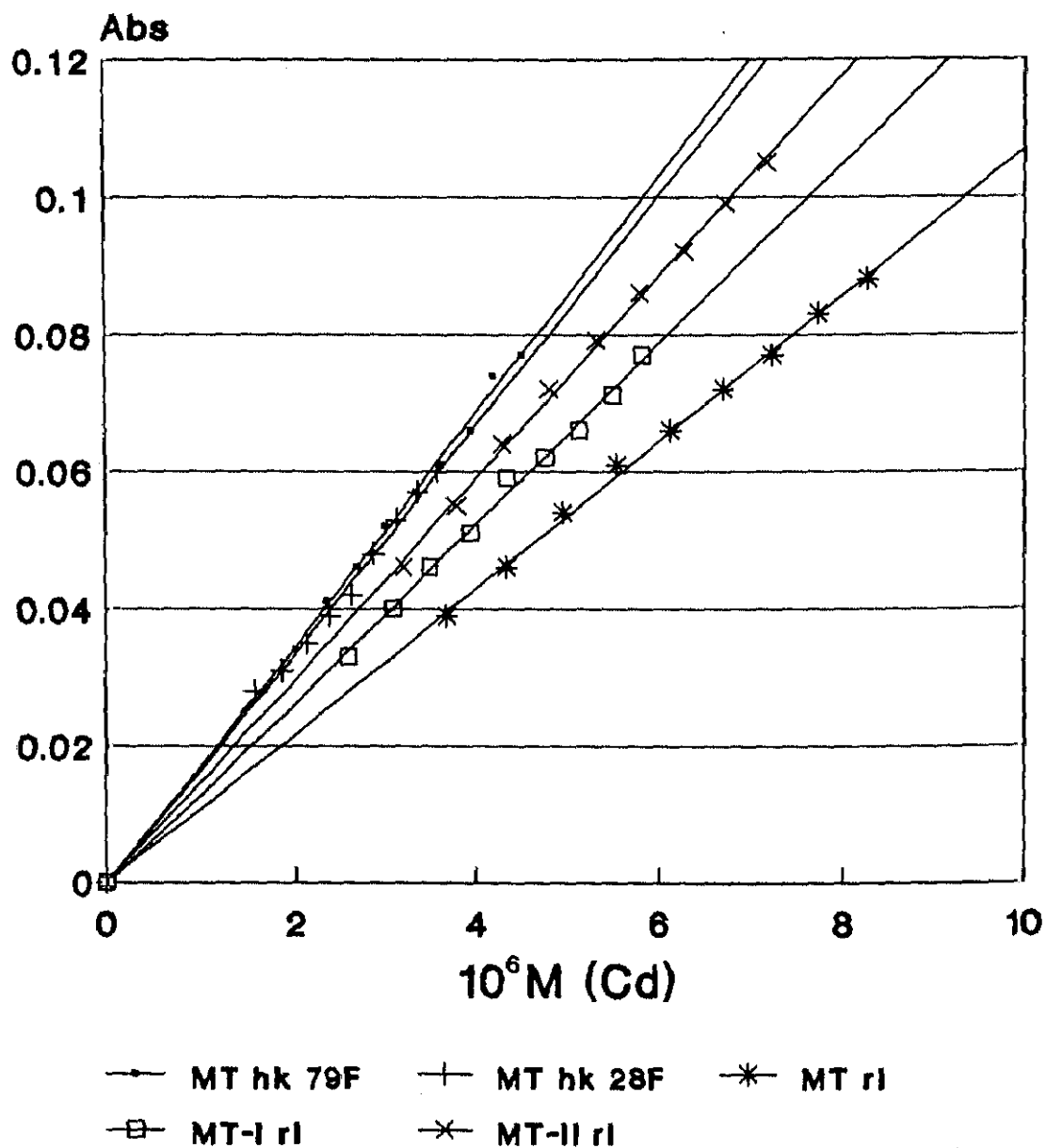


Fig. 79. Representación de la absorbancia a 250 nm en función del contenido total de Cadmio para las cinco MT comercializadas.

Absorbancia a 250 nm en función de la concentración de Zinc

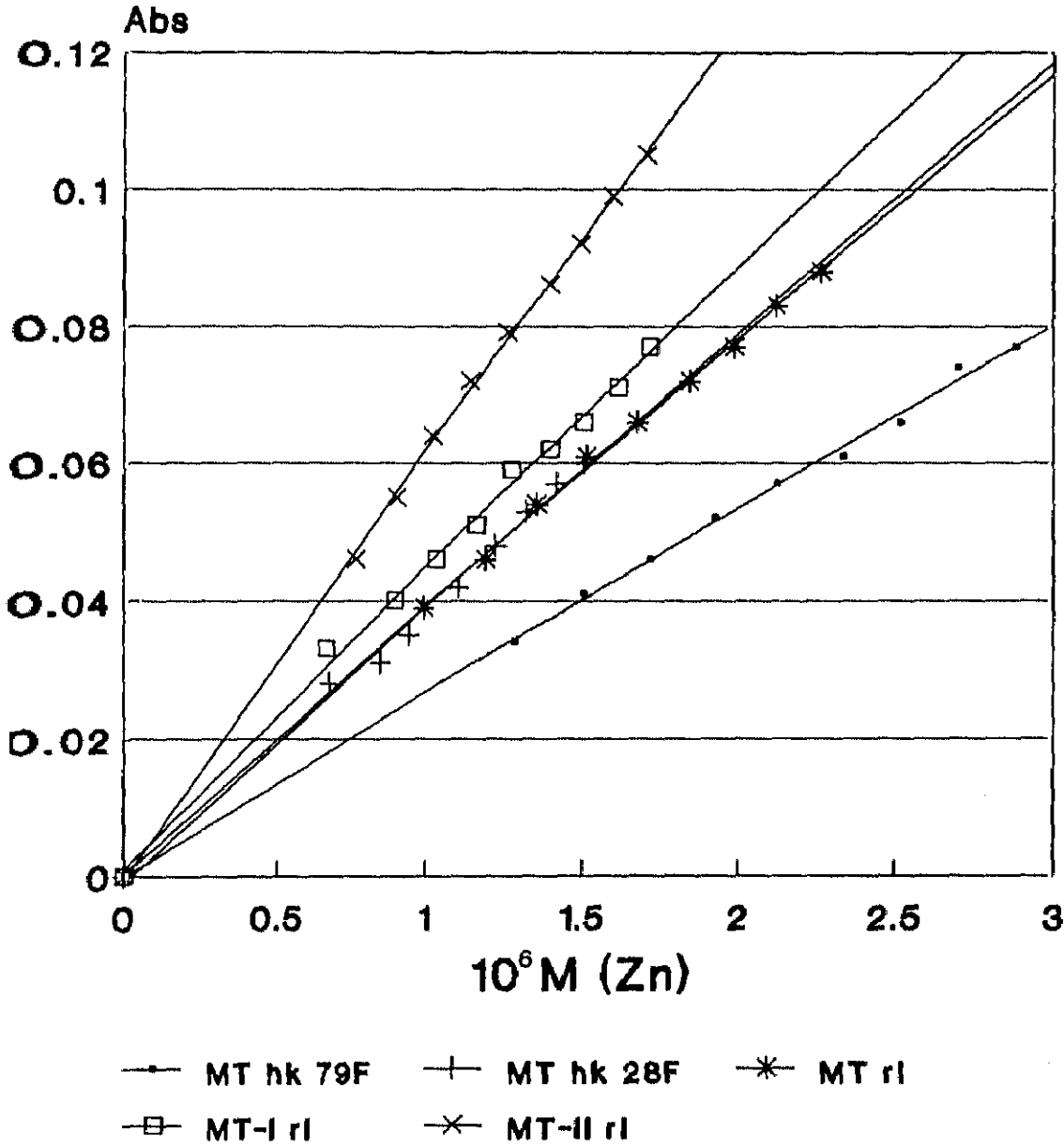


Fig. 80. Representación de la absorbancia a 250 nm en función del contenido total de Zinc para las cinco MT comercializadas.

Cuando se representó la absorbancia a 204nm en función de la concentración total de producto (fig. 73-74) se encontró una recta única para las cinco MT, a partir de cuya pendiente se calculó el coeficiente de absorción molar y se obtuvo un valor ϵ_{204} comprendido entre $2.9-3.38 \cdot 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Esta recta única nos permite afirmar que las tioneínas presentan un mismo comportamiento y que la absorción debida a la parte orgánica de la metalotioneína es análoga para las diferentes MT estudiadas, independientemente del origen de las mismas. Por lo tanto, nos sirven como método cuantitativo de valoración. Las características analíticas del método de valoración propuesto se indican en la tabla 23.

Tabla 23. Características del método analítico de valoración de las metalotioneínas.

CARACTERISTICAS DEL METODO DE VALORACION
Intervalo de linealidad estudiado: $3.5 \cdot 10^{-7} - 1.72 \cdot 10^{-5} \text{ M}$
Ecuación de la recta: $y = 7.9 \cdot 10^{-4} + 3.2 \cdot 10^5 X$
Coefficiente de variación: 7.6 %
Limite de detección: $3.01 \cdot 10^{-7} \text{ M}$

Los valores de absorción molar obtenidos están en buen acuerdo con los datos publicados anteriormente (12), así como con los que se pueden calcular por adición de las contribuciones de la absorbancia a 200 nm del conjunto de grupos funcionales que forman parte de la molécula ($\epsilon=4.58 \cdot 10^5$).

Estos valores son ligeramente superiores a los obtenidos anteriormente en la parte consagrada al estudio de los diferentes parámetros del medio.

Si se representa esta absorbancia en función del contenido total metálico, no se encuentra una recta única, tal y como se puede observar en la figura 75. Al contrario, la absorbancia presenta una relación inversa al contenido metálico. Esto se puede explicar por el hecho de que cuanto mayor contenido metálico exista en la MT mayor número de grupos tiólicos estarán asociados al metal y, por tanto, habrá menos grupos tiólicos libres que contribuyan a la absorbancia en esta longitud de onda. Se puede comprobar, además, que el valor de la pendiente es inversamente proporcional al contenido metálico existente en las proteínas, esto puede explicarse por el hecho de que el número de grupos tiólicos libres, grupo que contribuye a esta absorbancia, es mayor cuanto menor sea el contenido metálico.

Cuando se estudió la absorbancia en el hombro, longitud de onda a 240, 250 y 260nm, en función del contenido metálico se obtuvieron las gráficas de las figuras 76-78. En ellas se observa que aunque la pendiente es muy parecida, como se puede comprobar en la tabla 22, no es igual. La diferencia en las pendientes se debe a que la onda que aparece es una mezcla de dos, la atribuida a Zn-S y la del Cd-S, metales que se encuentran en diferente proporción en cada una de las 5 MT. Como el contenido en cada uno de estos metales depende de la naturaleza de la MT, por lo tanto, las pendientes dependen de este factor y, varían en función de la relación existente entre el contenido de cadmio y de zinc.

IV.D. DISCUSION GENERAL

La espectrofotometría de absorción molecular U.V. ha sido empleada como método de determinación de las metalotioneínas, de algunos polipéptidos y de la cisteína por su sencillez y rapidez del análisis.

Los resultados obtenidos para los tres compuestos estudiados son coherentes. Se obtiene un máximo de absorción, que se atribuyen a la parte orgánica de la molécula, a la misma longitud de onda, 200-205 nm, tanto para la cisteína, como para el fragmento terminal 56-61 y las metalotioneínas. El valor del coeficiente de absorción molar, en el máximo, aumentan según la siguiente secuencia: Cys < F < MT, lo cual es lógico si se tiene en cuenta que el número de grupos funcionales que participan en esta absorción aumenta en el mismo orden.

Los espectros de las metalotioneínas y de una disolución de fragmento + cationes son análogos. Presentan, además del máximo, un hombro de absorción en el intervalo de longitudes de onda que oscila entre 225 y 255 nm que se atribuye a los enlaces metal-tiol. Esta absorción en el hombro también se obtiene cuando se tiene cisteína + cadmio y/o zinc en la disolución pero, no se produce cuando estos cationes no están presentes en las disoluciones de fragmento o cisteína. Pero existe una excepción, la cisteína disuelta en medio TRIS presenta un hombro de absorción próximo a los 230 nm, que se ha atribuido a una interacción entre el soluto y el solvente, ya que cuando el medio es fosfato no se produce.

Debemos indicar que en una disolución que presenta fragmento+cadmio+zinc o metalotioneína no se puede discriminar de la absorbancia debida a los enlaces metal-tiolato, cual es la contribución debida al cadmio-tiol y la del zinc-tiol.

A partir de los resultados indicados podemos indicar que la espectrofotometría de absorción molecular U.V. se puede utilizar como método de determinación del tipo de compuesto existente en disolución. También se puede discriminar si la metalotioneína se encuentra unida a cationes o en su forma de apoproteína y, por tanto, es un método de aproximación a los estudios fundamentales de complejación y especiación. A partir de la absorbancia en el intervalo 225-255 nm se puede obtener un valor aproximado del contenido metálico, pero existen otros métodos como la espectrometría de absorción atómica mucho más eficaces para valorar los metales existentes en la muestra.

Se puede utilizar la absorbancia en la zona del máximo como método de valoración de este tipo de compuestos. Las características fundamentales de este método se indican en la tabla 24, en ella se indica el intervalo de concentraciones para el que se ha estudiado, la ecuación de la recta y los valores del coeficiente de variación y límite de detección, para cada uno de los compuestos, cisteína, fragmento y las cinco metalotioneínas para las que se obtuvo una recta única.

Tabla 24. Características analíticas del método de valoración para los compuestos estudiados: cisteína, fragmento terminal 56-61 y metalotioneínas.

MUESTRA ESTUDIADA	CARACTERISTICAS DEL METODO ANALITICO DE VALORACION
CISTEINA	<p>Intervalo de linealidad: $0.8 \cdot 10^{-4} - 8.1 \cdot 10^{-4} \text{ M}$</p> <p>Ecuación de la recta: $y = 3.36 \cdot 10^{-3} + 8.31 \cdot 10^4 \text{ X}$</p> <p>Coefficiente de variación: ± 0.2258 2.7 %</p> <p>Límite de detección: $0.271 \cdot 10^{-4} \text{ M}$</p>
FRAGMENTO TERMINAL 56-61	<p>Intervalo de linealidad: $2.32 \cdot 10^{-3} - 8.53 \cdot 10^{-3} \text{ M}$</p> <p>Ecuación de la recta: $y = 0.216 \cdot 10^{-3} + 1.8 \cdot 10^4 \text{ X}$</p> <p>Coefficiente de variación: ± 0.335 18%</p> <p>Límite de detección: $1.878 \cdot 10^{-3} \text{ M}$</p>
METALOTIONEINA	<p>Intervalo de linealidad: $3.5 \cdot 10^{-7} - 1.72 \cdot 10^{-5} \text{ M}$</p> <p>Ecuación de la recta: $y = 7.9 \cdot 10^{-4} + 3.2 \cdot 10^5 \text{ X}$</p> <p>Coefficiente de variación: ± 0.098 7.6%</p> <p>Límite de detección: $3.01 \cdot 10^{-7} \text{ M}$</p>

V. ESTUDIO ELECTROQUIMICO DE LAS METALOTIONEINAS,
LA CISTEINA Y EL FRAGMENTO TERMINAL 56-61

V. ESTUDIO ELECTROQUIMICO DE LAS METALOTIONEINAS, LA CISTEINA Y EL FRAGMENTO TERMINAL 56-61.

V.A. INTRODUCCION

Los métodos electroquímicos de análisis son un conjunto de métodos que nos permiten diferentes posibilidades de estudios de investigación fundamental. La respuesta de un sistema electroquímico dado depende de la forma química de las especies que intervienen, sobre ella influyen las reacciones químicas en disolución, por lo tanto, no sólo se pueden variar los parámetros instrumentales, sino también, modificar las condiciones de la disolución, lo que implica una modificación de la respuesta electroquímica y obtener información sobre los compuestos.

Para que estos métodos se puedan aplicar es necesario que existan especies electroactivas en el sistema, bien en disolución, bien que interaccionan con el electrodo.

Los métodos electroquímicos se han aplicado a numerosos compuestos orgánicos, en particular a aquéllos que presentan funciones tiol ($-SH$) que pueden participar en un sistema electroquímico en disolución acuosa u orgánica. Existen numerosos trabajos sobre el estudio de las propiedades electroquímicas de esta moléculas, en particular, una amplia revisión bibliográfica reciente sobre la aplicación de los métodos electroquímicos a las proteínas y, en la cual, se cita la posibilidad de aplicar estos métodos a las metalotioneínas (311).

En la síntesis de trabajos electroquímicos publicados hasta el momento, nos centramos en aquéllos que estudian compuestos orgánicos de diferente naturaleza que presentan aminoácidos en su molécula con grupos tiólicos, por semejanza con la estructura de las metalotioneínas, objeto de nuestro estudio.

El primer método polarográfico para la determinación de proteínas que presentan grupos tiólicos fue descrito por Brdicka en 1933 (312). El mecanismo electroquímico responsable de la actividad polarográfica de estas proteínas es un complejo Co-S-proteína del que se libera un hidrógeno que presenta una onda catalítica.

Modificaciones de este método se han empleado posteriormente, dirigidas por un lado a su aplicación a fenómenos bioquímicos, como pueden ser los posibles fenómenos de desnaturalización de las proteínas (313), como al empleo de técnicas polarográficas analíticas mas desarrolladas, tales como la polarografía diferencial de impulsos (314).

En la tabla 25 se agrupan diversos estudios electroquímicos recientes. Como es imposible recopilar todos los trabajos publicados, objetivo que se saldría del marco de nuestro estudio, se han elegido aquellas publicaciones que se orientan hacia el estudio de las características químico-físicas del comportamiento electroquímico de dichas sustancias, en particular del punto de vista fundamental, proceso electroquímico, la influencia de parámetros, etc. En primer lugar, se han seleccionado publicaciones con respecto a moléculas que contienen el grupo tiólico para obtener una información sobre los procesos de oxidación-reducción de estos grupos funcionales, puentes en las moléculas estudiadas por nosotros. Seguidamente, se presentan los estudios relacionados con diversos tipos de proteínas de estructuras complejas (Albúmina, citocromos, ferredoxinas, insulina). En último lugar, todos los trabajos encontrados relacionados con las metalotioneínas de diferente procedencia.

En la tabla 25 se indica el tipo de muestra empleada para el estudio, así como la técnica empleada en cada caso y el tipo de electrodo utilizado. También se ha considerado interesante señalar el medio en que se llevó a cabo la experiencia y el tipo de estudio efectuado.

Tabla 25. ESTUDIOS POLAROGRAFICOS DE LAS
MT Y SUSTANCIAS RELACIONADAS

MUESTRA	METODO	ELECTRODO	MEDIO	ESTUDIO REALIZADO	Ref.
Diferentes tioles	- D.P.P.	gota Hg	-----	Estudio del proceso electroquímico en el electrodo. $i_p = f(c)$ $E_p = f(c)$ límite de detección	315
tióles olorosos de bajo peso molecular.	- D.P.P. - dc.polarog. - L.S.V.	gota Hg	- pH 12.9 NaOH 0.2 M - pH 11.3 NaCO ₃ 0.1M - pH 9.0 Na ₂ HPO ₄	Estudio del proceso electroquímico anódico y catódico en el electrodo. $i_p = f(c)$, depende del origen de la MT. No comparables.	316
Cisteína Cistina	- C.V.	gota Hg	tampón: fosfato sódico	Fenómenos electroquímicos que rigen el proceso: - cistina: difusión - cisteína: adsorción	317
Cisteína Cistina	- C.V.	gota Hg recubierta con supresores de máximos y mínimos.	TRIS-HCl 0.01M Fosfato Na 0.01 M pH 7.6	Estudio comparativo de ambos compuestos en los dos medios Influencia de supresores de máximos polarográficos con respecto a la difusión.	318

MUESTRA	METODO	ELECTRODO	MEDIO	ESTUDIO REALIZADO	Ref.
Cisteína Cistina	- C.V.	gota Hg	Tampones: NaNO ₃ 0.09M HNO ₃ 0.01M	Procesos en el electrodo Reversibilidad del sistema Electroquímica controlada por la difusión Influencia de la presencia de otros cationes en los procesos en el electrodo.	319
Cisteína Cistina Selenocisteína	- C.S.V. (Voltametría redisolución catódica)	gota Hg	HClO ₄ 0.1M H ₂ SO ₄ 0.1M	Influencia del catión asociado. Diferencias entre los compuestos estudiados. Estabilidad de los mismos. Optimización de parámetros	320
Pentotal Na ác.tiobarbitúrico	- dc.polarog. - ac.polarog. - D.P.P.	gota Hg	-----	Fenómenos electroquímicos que rigen el proceso. Influencia de concentración. Influencia del pH.	321

MUESTRA	METODO	ELECTRODO	MEDIO	ESTUDIO REALIZADO	Ref.
Disulfiran	<ul style="list-style-type: none"> - dc.polarog. - ac.polarog. - D.P.P. - C.V. 	gota Hg	Alcohol 40% (V/V)	<p>Fenómenos electroquímicos que rigen el proceso de adsorción.</p> <p>Estudio en función de la concentración.</p> <p>Estudio en función del pH</p>	322
Tiopronin (N(2-mercapto propinil)glicina)	<ul style="list-style-type: none"> - dc.polarog. - ac.polarog. - D.P.P. 	gota Hg	tampones: <ul style="list-style-type: none"> - pH<5 NaAcO/HAcO - pH=5.9 Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ - pH>10 Na₂CO₃/NaHCO₃ 	<p>Curvas electrocapilarias</p> <p>Estudio de los parámetros fundamentales</p> <p>Influencia del pH</p> <p>Proceso en el electrodo: fenómenos de adsorción</p>	323
Glutación	<ul style="list-style-type: none"> - dc.polarog. - ac.polarog. - D.P.P. 	gota Hg	tampones: <ul style="list-style-type: none"> - Clark y Lubs pH<8 -Bates y Bower pH>8 	<p>Optimización de parámetros para cuantificación</p> <p>Ondas electrocapilarias</p> <p>Influencia del pH.</p>	324

MUESTRA	METODO	ELECTRODO	MEDIO	ESTUDIO REALIZADO	Ref.
Albúmina (BSA) Desoxirribonuclease I Ribonucleasa pancreática Lisozima Insulina Tripsina	- D.P.P.	gota Hg	Brdicka	Método de cuantificación Concentración límite Supresores de máximos Comparacion con los resultados obtenidos en espectrofotometría	325
Citocromo-C	- dc.polarog. culombimetría	gota Hg Pt Au	TRIS 0.05M pH 6.05 +ác.cacodítico 0.05M + ClO_4^- 0.1M	Fenómenos electroquímicos que rigen el proceso. Reacción en el electrodo. Comparación de respuestas obtenidas en diferentes electrodos sólidos.	326
Insulina	- C.V. culombimetría	gota Hg	Fosfato Na 0.1M pH 7.4	Proceso electroquímico que rige el fenómeno: Adsorción Estudio de los parámetros fundamentales.	327
Albúmina	- C.V.	gota Hg	tampón fosfato 0.1M pH 7.4	Caracterización del proceso electroquímico: adsorción previa. Elucidación del mecanismo de reacción en el electrodo. Estudio en función del tiempo	328

MUESTRA	METODO	ELECTRODO	MEDIO	ESTUDIO REALIZADO	Ref.
Ribosa Albúmina Lisozima Insulina Aminoácidos Glutación Poliaminoácido Apamina	- D.P.P - L.S.V.	grafito	Tampón: Britton- Robinson	Identificación de los E_p de cada una de las macromoléculas Estudio del mecanismo electroquímico que rige el proceso en el electrodo: Adsorción.	329
Riboflavina Flavina mononucleótido Alloxacina	- D.P.S. - C.V. - A.S.D.P.V	gota Hg	NaOH $10^{-3}M$	Estudio de las características de estas proteínas. Caracterización de las proteínas por asignación de potencial de pico. Estudio de las características del método. Límite de detección.	330
Ferricitocromo -c	- C.V.	Au Carbono cristalizado	- H_2O - sol.metanol	Reversibilidad del proceso Dependencia del pH	331
Ferredoxinas	- D.P.P. - C.V.	gota Hg	Tricina 0.02M +NaCl 0.1M pH8 para variar el pH: - NaAcO 0.02M - NaBorato 0.02M	Estudio de E_p característico Influencia de la adición de metales. Favorecen la difusión. Influencia del pH	332

MUESTRA	METODO	ELECTRODO	MEDIO	ESTUDIO REALIZADO	Ref.
DNA	- C.V. - A.S.D.P.P.	gota Hg	fosfato Na 0.1M pH 6.9	Estudios fundamentales sobre la estructura y propiedades del DNA Empleo del OsO_4 y cloroacetaldehído como biomarcadores.	333
Cisteína Glutati6n Peptido: N-acetil-cys-met	- D.P.P.	gota Hg S.D.M.E.	tamp6n TRIS 0.01M pH 9.1	Respuesta polarogr6fica de los complejos tiol-metales (Cd,Zn). Estudio de la estequiometria y la cin6tica de formaci6n del complejo. Determinaci6n de las constantes de estabilidad Interacci6n Cd^{2+} y Zn^{2+} para formar el complejo	334

MUESTRA	METODO	ELECTRODO	MEDIO	ESTUDIO REALIZADO	Ref.
Albumina Insulina Glutation Cisteína Cistina Peptido sintético SIGMA MT	- D.P.P.	gota Hg	Brdicka	Diferencias de respuesta de los distintos compuestos	335
	- C.V.	gota Hg	tampón fosfato 0.1M pH7.4	Estudio como método de valoración Respuesta depende del grado de oxidación no del contenido metálico	
	- D.P.P.	gota Hg	tampón bitalato K 0.1M pH2.5	Respuesta anódica y catódica depende del origen, contenido metálico y orientación de la molécula en el electrodo. Estudio de la sensibilidad del método para valorar los diferentes (Cu, Cd, Zn)	
MT hepática de rata	- D.P.P.	gota Hg	Brdicka	Método valoración de la cinética de inducción de las MT por diferentes metales. Cinética lineal hasta alcanzar la saturación. Interferencia con otras proteínas de bajo peso molecular. Método de valoración del contenido	336

MUESTRA	METODO	ELECTRODO	MEDIO	ESTUDIO REALIZADO	Ref.
MT hígado y riñón inducidas por CdCl_2 y ZnClO_4	- Saturación con cadmio y análisis por A.A.S. - D.P.P.	gota Hg	Brdicka	Comparación del contenido de MT por ambos métodos Valores D.P.P. > saturación con cadmio. Coeficiente de correlación 0.92-0.95 Método adecuado para cuantificar MT.	337
"Scylla serrata" Cd-T	- D.P.S.	gota Hg	Brdicka + tensoactivo (TRITON X-100)	Asignación de picos Efecto del tensoactivo Efecto de la temperatura Efecto de la adición de metales sobre la MT saturada	338
"Scylla serrata" MT-I	- D.P.P.	S.M.D.E.	Brdicka + TRITON X-100	Estudio de los parámetros característicos Influencia de la temperatura Estudio de la relación i_p y el número de cisteínas. Estudio de la relación i_p y el peso molecular de la proteína.	339

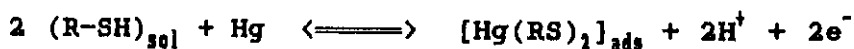
MUESTRA	METODO	ELECTRODO	MEDIO	ESTUDIO REALIZADO	Ref.
BSA Apomioglobina MT: ratón, cangrejo y cianobacterias ZnT humana "Neurospora crassa"	- C.V.	gota Hg	- HEPES $2 \cdot 10^{-2}$ M pH 7.3 - Brdicka	Proceso en el electrodo: Adsorción Efecto de la adición de metales Efecto de la oxidación Identificación de picos	340
MT invertebrados marinos	- D.P.P.	gota Hg	Brdicka + TRITON X-100 $2.5 \cdot 10^{-2}\%$ (V/V)	Designar y evaluar un protocolo sensible para evaluar y cuantificar MT. Estudio de los parámetros característicos del método analítica.	341

De los resultados obtenidos por diversos autores cuyos trabajos se han reagrupado en la tabla se pueden seleccionar un cierto número de consideraciones íntimamente relacionadas con nuestro trabajo.

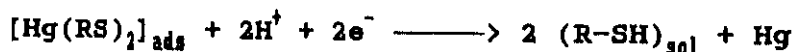
El potencial, parámetro característico de un sistema dado, correspondiente a la reacción electroquímica del mercurio formado por la presencia de grupos tioles, en D.P.P., depende de la estructura molecular (316) de la propia molécula que contiene dichos grupos, -S- y de los grupos funcionales que están próximos. Se pueden considerar dos grupos: E_p comprendido entre -0.23 y -0.52 V para compuestos de peso molecular bajo, <1000, (315,318) y entre -0.70 y -0.80 V para los que presentan mayor masa molecular (316,329).

El mecanismo de reacción en el electrodo propuesto más corrientemente admitido (317,318,321-323,327,328) comprende una etapa de oxidación del mercurio con adsorción de los grupos -SH en el electrodo, en esta etapa interviene la capa superficial del mercurio en la formación de mercuriotiolatos y una etapa posterior en la cual se produce la reducción de la especie adsorbida.

Las diferentes etapas de este mecanismo, propuesto por Bard (317,327,328) se pueden esquematizar de la siguiente manera:



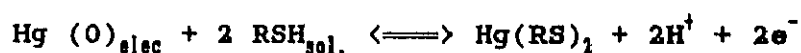
seguido del equilibrio en sentido inverso:



que corresponde a la reducción del tiolato de mercurio adsorbido previamente.

Este mecanismo propuesto depende de la concentración del compuesto en disolución. Es probable que la etapa de adsorción

intervenga para concentraciones elevadas. Para concentraciones bajas, menos de 10^{-4} M, como las que se han utilizados en nuestro trabajo, el mecanismo que se propone y que se justificará a lo largo de este capítulo es más simple y corresponde a la oxidación del mercurio del electrodo en presencia de un agente complejante (342).



Se admite, de momento, que el número de electrones que intervienen en el proceso es igual a 2, es decir, se admite la hipótesis que el mercurio, en este medio se oxida a su grado de oxidación (II), ión mercúrico y no al grado de oxidación I, ión mercurioso. Esta hipótesis que se manejará a lo largo de la discursión en todo este capítulo no está, en la actualidad, confirmada y es posible que en este medio, con iones cloruro, la especie que predomine sea Hg(I) en el proceso de oxidación pero que se dismute y, por tanto, exista probablemente la mezcla de Hg(I) y Hg(II).

Si el grupo tiol está asociado a cationes metálicos el proceso descrito previamente debe modificarse por los enlaces S_xM existentes (319).

Por otra parte, la señal obtenida depende del medio en que se encuentra disuelto el compuesto (318). Debido a que los compuestos estudiados presentan propiedades ácido-base, el pH de la disolución interviene en el proceso (317,324).

Mediante polarografía oscillográfica (319) se ha detectado la formación de tiolatos de dos grados diferentes de oxidación del mercurio (I y II). La formación del complejo con menor grado de oxidación viene controlado por el proceso de difusión, mientras que la formación del segundo se rige por la adsorción.

Los métodos electroquímicos se han empleado, así mismo, en la determinación cuantitativa de las MT y de otros compuestos que

contienen grupos tiólicos en la molécula (335-339, 341). En estas determinaciones generalmente se emplea el método de Brdicka en el cual la señal depende únicamente del grado de oxidación de los grupos tiólicos presentes en la molécula y de la concentración de los mismos, pero no del origen o del contenido metálico de estos compuestos (335, 338).

En otros métodos en los que se determina de forma directa la señal polarográfica que produce el compuesto en el electrodo de mercurio. La señal depende del contenido metálico y de la naturaleza de la molécula a analizar, así como de la naturaleza y del pH del medio en que se encuentre disuelta y, de la posible orientación en la superficie del electrodo. Estos métodos directos se han orientado principalmente, más que a la cuantificación, hacia la identificación de los potenciales de pico característicos de diferentes compuestos orgánicos y de la influencia que sobre esta señal ejerce la adición de cationes metálicos.

Nuestro estudio se ha centrado en el empleo de técnicas electroquímicas con las cuales se pueda obtener información de compuestos que contienen grupos tioles. Se ha empleado el electrodo de mercurio, sea de goteo, sea de gota fija; la mayor parte de los trabajos se han llevado a cabo con la técnica de polarografía diferencial de impulsos (D.P.P.), aunque también se han utilizado la polarografía clásica (D.C.P.) y la voltametría de redisolución anódica (D.P.S.).

La mayor parte de este capítulo de la memoria está consagrado a la caracterización y determinación de MT procedentes de diferente origen. Como este tipo de moléculas presentan una estructura que no está perfectamente definida ni conocida, nos ha parecido interesante, como ya se ha indicado en el capítulo dedicado a los resultados espectrofotométricos, realizar un estudio paralelo, más limitado, con moléculas de características parecidas, pero con una estructura más simple y conocida. Se ha elegido la cisteína y el fragmento terminal 56-61 de la MT. Este

último compuesto presenta un particular interés porque forma parte intrínseca de la metalotioneína, es el único péptido, que nosotros conozcamos, que se encuentra sintetizado y comercialmente accesible.

No se han encontrado estudios en la literatura sobre este último compuesto. Por lo tanto, es el primer trabajo en electroquímica sobre sus propiedades y características. Los resultados polarográficos de este compuesto pueden permitir la comparación con resultados similares obtenidos para las MT de los que se pueden deducir analogías y diferencias.

Como se refleja en la tabla 25 los estudios electroquímicos sobre las MT son poco numerosos y las conclusiones que se pueden deducir son limitadas. En el estudio que se presenta se han tenido en cuenta diversos aspectos, las propiedades ácido-base y de complejación de cationes metálicos, los procesos electroquímicos que se pueden producir en un electrodo de gotas de mercurio con el posible fenómeno de absorción de moléculas orgánicas que contienen grupos tioles, la variación de la respuesta polarográfica con la concentración y su dependencia respecto al origen de la muestra, etc.

El orden que se ha elegido para presentar los resultados experimentales obtenidos por métodos electroquímicos tiene en cuenta esas diferentes consideraciones. Así, en primer lugar se presenta el estudio realizado con metalotioneínas comercializadas procedentes de hígado de conejo y de riñón de caballo. Se tiene en cuenta la influencia de diferentes parámetros, tales como el medio utilizado y el pH de la disolución sobre el comportamiento electroquímicos de estas moléculas. A partir de esto, se pueden evaluar las constantes de asociación metal-tioneína de los cationes cadmio y zinc contenidos inicialmente en estos compuestos. Los procesos en el electrodo son de gran importancia para elucidar el mecanismo que interviene en la reacción electroquímica así como el fenómeno que rige ese proceso; por ello, se han llevado a cabo algunos estudios, no exhaustivos

sobre la determinación de parámetros electroquímicos fundamentales, número de electrones que se intercambian y comparación de coeficientes de difusión en diferentes condiciones experimentales, así como varios ensayos que permiten determinar la importancia que los fenómenos de adsorción en una superficie de mercurio desempeñan en este tipo de moléculas complejas. La variación de la respuesta polarográfica en diferentes condiciones, en función del tiempo, da una idea de la estabilidad de las MT y de su degradación, tanto, desde el punto de vista de la desorción de cationes metálicos inicialmente unidos como de posibles modificaciones en su estructura orgánica. Con el método electroquímico de D.P.P. se puede relacionar la señal obtenida, intensidad de corriente, con la concentración de un compuesto en disolución por lo que se han realizado diferentes experiencias con el fin de proponer esta técnica como método de análisis cuantitativo de una MT en un medio dado. Por otra parte, como la respuesta polarográfica aparece a un potencial característico de una sustancia determinada, se propone como método de determinación de la forma química, especiación, de cationes libres o bien unidos a la proteína.

De los estudios análogos realizados con cisteína y fragmento terminal 56-61 se pueden deducir similitudes y diferencias entre los diferentes compuestos con lo que se obtienen resultados comparables con métodos electroquímicos.

Finalmente se expone una discusión conjunta de todos los resultados experimentales presentados en este capítulo.

V.B. PARTE EXPERIMENTAL

V.B.1. APARATOS

En el análisis electroquímico se han utilizado:

- Analizador polarográfico EG&G Par modelos 384 y 384B equipado con una célula electrolítica 303 SMDE con tres electrodos:
 - electrodo de trabajo: SMDE
 - electrodo de referencia: Ag/AgCl
 - electrodo auxiliar: Pt

Para medir el pH de las soluciones preparadas se utilizó un pH-metro: MINISIS 5000 de Tacussel y como agitador Heidolph MR 2002.

El equipo para destilar el agua es "Autostill Double D-Ionstill".

Se emplearon micropipetas "Eppendorf" para realizar las adiciones patrón: 10-100 μ L, 20 μ L, 50 μ L.

V.B.2. MUESTRAS

- Las muestras comercializadas por SIGMA de MT, ya enumeradas en el capítulo III de esta memoria.

- El fragmento 56-61 L4512 lot. 39F5810 sintético y comercializado por SIGMA en forma de sal acética del 80% de riqueza y constituido por la siguiente secuencia de aminoácidos:

Lys-Cys-Thr-Cys-Ala

lleva mercaptoetanol como agente reductor.

- La L-cisteína C-7755 lot. 114F0672 comercializada por SIGMA.

- TRIS (hidroximetil) aminometano Merck proanálisis

- H₂O bidestilada

- Disolución HCl 0.1M para ajustar el pH

- Disolución NaOH 0.1M para ajustar el pH

- Na₂HPO₄ Merck "pro-análisi"

- NaH₂PO₄ Merck "pro-análisi"

- Disoluciones estándar TITRISOL, Merck 1000µg·mL±2µg·mL de CdCl₂ y ZnCl₂.

- Disolución estandar de E.D.T.A., J.Baker 10⁻²M.

Todas las disoluciones se guardan en refrigerador a 4°C.

V.B.3. PREPARACION DE DISOLUCIONES

En este apartado se indican las disoluciones empleadas en cada uno de los estudios realizados. Debemos señalar que la mayoría de éstos se han llevado a cabo con la MT "rabbit liver" M7641 lot. 20H9650 preparada en dos medios tampón TRIS·HCl 2.5·10⁻¹ a pH=7.5 y pH=2.0.

Para el estudio de la influencia del pH se utilizaron disoluciones de la MT r.l. M7641 lot. 20H9650 de una concentración 7.69·10⁻⁷M preparadas en TRIS·HCl 2.5·10⁻¹ en un intervalo de pH que oscila entre 2.0 y 10.0.

En el estudio comparativo de las cinco MT se prepararon disoluciones $7.69 \cdot 10^{-7} \text{M}$ de cada una de las MT en disolución tampón TRIS·HCl $2.5 \cdot 10^{-2}$ a pH 7.5 y 2.0. Se estudiaron, además, de disoluciones de CdCl_2 y ZnCl_2 para comparar.

En el estudio comparativo del comportamiento en medio fosfato se prepararon dos disoluciones $1.54 \cdot 10^{-6} \text{M}$ de MT-II r.l. M5392 lot. 79F9545 en tampón fosfato $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ $4 \cdot 10^{-2} \text{M}$ a pH 7.4 y 2.0.

Para la determinación de los parámetros polarográficos n y D se utilizó una disolución de MT r.l. M7641 lot. 20H9650 preparada en TRIS·HCl $2.5 \cdot 10^{-2}$ a pH 7.5 y 2.0.

Para las adiciones patrón de CdCl_2 se preparó una disolución de MT r.l. ($7.69 \cdot 10^{-7} \text{M}$) en TRIS·HCl en la que se realizaron adiciones de CdCl_2 cuyas concentraciones oscilaron entre $1.65 \cdot 10^{-7}$ y $3.3 \cdot 10^{-6} \text{M}$.

Las adiciones de ZnCl_2 se realizaron en una disolución de MT r.l. preparada a diferentes pH, 6.0, 7.5, 8.0 y 10.0. Las cantidades de zinc añadidas varían entre $1.01 \cdot 10^{-6}$ y $4.04 \cdot 10^{-6} \text{M}$. A pH 8.5 se realizaron adiciones a menores concentraciones de $2.85 \cdot 10^{-7}$ y $8.53 \cdot 10^{-7} \text{M}$.

En los estudios en función del tiempo y presencia de mercurio en el seno de la disolución se utilizó la MT r.l. de concentración $7.69 \cdot 10^{-7} \text{M}$ en TRIS a pH 7.5 y 10.

Los estudios en de la influencia de la concentración se realizaron con concentraciones variables de las cinco MT preparadas en TRIS·HCl, que oscilaron entre:

- $1.57 \cdot 10^{-7}$ y $1.83 \cdot 10^{-6} \text{M}$ para la MT h.k. lot. 79F9670
- $2.26 \cdot 10^{-7}$ y $2.69 \cdot 10^{-6} \text{M}$ para la MT h.k. lot. 28F9545
- $1.92 \cdot 10^{-7}$ y $1.93 \cdot 10^{-6} \text{M}$ para la MT r.l. lot. 20H9650
- $3.85 \cdot 10^{-7}$ y $2.31 \cdot 10^{-6} \text{M}$ para la MT-I r.l. lot. 129H9575
- $3.85 \cdot 10^{-7}$ y $2.31 \cdot 10^{-6} \text{M}$ para la MT-II r.l. lot. 79F9510

Para el estudio de la cisteína a dos pH se prepararon disoluciones de esta sustancia a concentraciones entre 4.13 y $6.19 \cdot 10^{-7}$ M en TRIS·HCl a los dos pH habituales 7.5 y 2.0. Para el cálculo de las rectas de calibrado se prepararon disoluciones de cisteína que oscilaban entre 4.13 y $7.18 \cdot 10^{-6}$ M para pH 7.5 y entre 4 y $25 \cdot 10^{-6}$ M para pH 2.0.

Para el estudio de la influencia del pH en el fragmento se prepararon disoluciones $1.56 \cdot 10^{-5}$ M este compuesto en TRIS·HCl a los pH de 1.90, 3.71, 7.5 y 8.94. La disolución preparada a pH 7.5 se utilizó para el estudio del fragmento en función del tiempo transcurrido.

El estudio de las adiciones patrón de CdCl_2 y ZnCl_2 se realizó con las mismas disoluciones de fragmento a los cuatro pH indicados anteriormente y en las cantidades que se indicarán cuando se desarrolle.

Las adiciones patrón del fragmento a una concentración $1.56 \cdot 10^{-5}$ M en otra disolución de MT r.l. preparada en el mismo medio a una concentración de $8.3 \cdot 10^{-7}$ M.

Para el estudio en función de la concentración se prepararon disoluciones del fragmento que oscilaban entre 4.59 y $12.4 \cdot 10^{-5}$ a pH 7.5 y de 3.12 y $12.4 \cdot 10^{-5}$ para pH 2.0.

V.B.4. METODOS ELECTROQUIMICOS EMPLEADOS

El método más utilizado en este trabajo es la polarografía de impulsos diferencial, D.P.P. Aunque también se han utilizado otros métodos como, la polarografía clásica y la voltametría de redisolución.

Debemos indicar que, para cada una de las disoluciones estudiadas, los polarogramas se realizaron al menos tres veces y que los resultados obtenidos representados a lo largo de este

capítulo son la media aritmética de las medidas realizadas. El equipo empleado se utiliza generalmente para la cuantificación de compuestos, no es un equipo adecuado para la investigación fundamental, por lo que los potenciales no son perfectamente reproducibles. Por esa razón, en los diversos polarogramas que se presentan el potencial de pico, E_p , de un compuesto dado puede variar ligeramente.

Para realizar los estudios de la influencia del pH y del comportamiento de las cinco MT a dos pH se empleó la D.P.P. en las siguientes condiciones: tiempo de purga 300s, velocidad de barrido 2mV/s y amplitud de impulso 50 mV.

Para el estudio en medio fosfato a pH 7.4 y 2.0 se utilizó la D.P.P. en las condiciones anteriormente indicadas.

Para la determinación de los parámetros electroquímicos n y D se emplearon la polarografía clásica con un tiempo de purga de 300 s y un intervalo de potenciales que se indican en cada caso. La D.P.P. en las mismas condiciones que en los dos estudios previos.

Para las adiciones patrón de $CdCl_2$ y $ZnCl_2$ se empleó la D.P.P. en las mismas condiciones.

En el estudio de la estabilidad de la MT se empleó la D.P.P. en las condiciones ya indicadas y la voltametría de redisolución anódica, con una velocidad de barrido de 2 mV/s, una amplitud de impulso de 50mV, un tiempo de depósito de 60 s y un tiempo de equilibrio de 30 s. Hay que señalar que entre lecturas, las muestras se mantuvieron en nevera con el mercurio en el seno de la cubeta.

La voltametría de redisolución anódica se utilizó esta técnica en función de algunos de sus parámetros característicos como son el tiempo de depósito y el tamaño de la gota. Las variaciones realizadas se indican posteriormente.

Para los estudios en función de la concentración en las cinco MT se utilizó la polarografía diferencial de impulsos diferencial con las mismas condiciones.

También se empleó la D.P.P. en todos los estudios realizados con la cisteína y el fragmento.

V.C. RESULTADOS Y DISCUSION

Se presentan en primer lugar los resultados obtenidos para la MT, que es el objeto de nuestro estudio. Se indican, en primer lugar, las características polarográficas, comportamiento frente a la adición de cationes, estabilidad y estudios en función de la concentración.

Seguidamente se muestran los trabajos realizados con la cisteína y el fragmento, constituyentes fundamentales de las MT, para poder comparar sus analogías y diferencias con la MT.

V.C.1. METALOTIONEINAS

La mayor parte de los estudios se han realizado con la MT r.1. M7641 lot.20H9650, una mezcla que presenta las dos isoformas I y II. El medio empleado generalmente es TRIS·HCl $2.5 \cdot 10^{-1}$ a pH 7.5, medio comunmente utilizado en los estudios biológicos.

V.C.1.A. COMPORTAMIENTO DE LAS MT EN FUNCION DEL pH

El estudio polarográfico se ha llevado a cabo por polarografía de impulsos diferencial (D.P.P.) en las condiciones indicadas en la parte experimental de este capítulo.

Se ha realizado un polarograma de la MT a pH 7.5 que se muestra en la figura 81b. Se observan tres picos bien definidos, $-0.38V$, $-0.80V$ y $-1.14V$ versus Ag/AgCl, que se denominan como $Ep_1(MT)$, $Ep_2(MT)$ y $Ep_3(MT)$, respectivamente. Con el fin de comparar los potenciales de estos tres picos se ha realizado, así mismo, un polarograma de las sales de los cationes cadmio(II) y zinc(II) en el mismo medio. Este polarograma se presenta superpuesto en la misma figura 81a. Se observa claramente que los potenciales de pico correspondientes a los cationes libres,

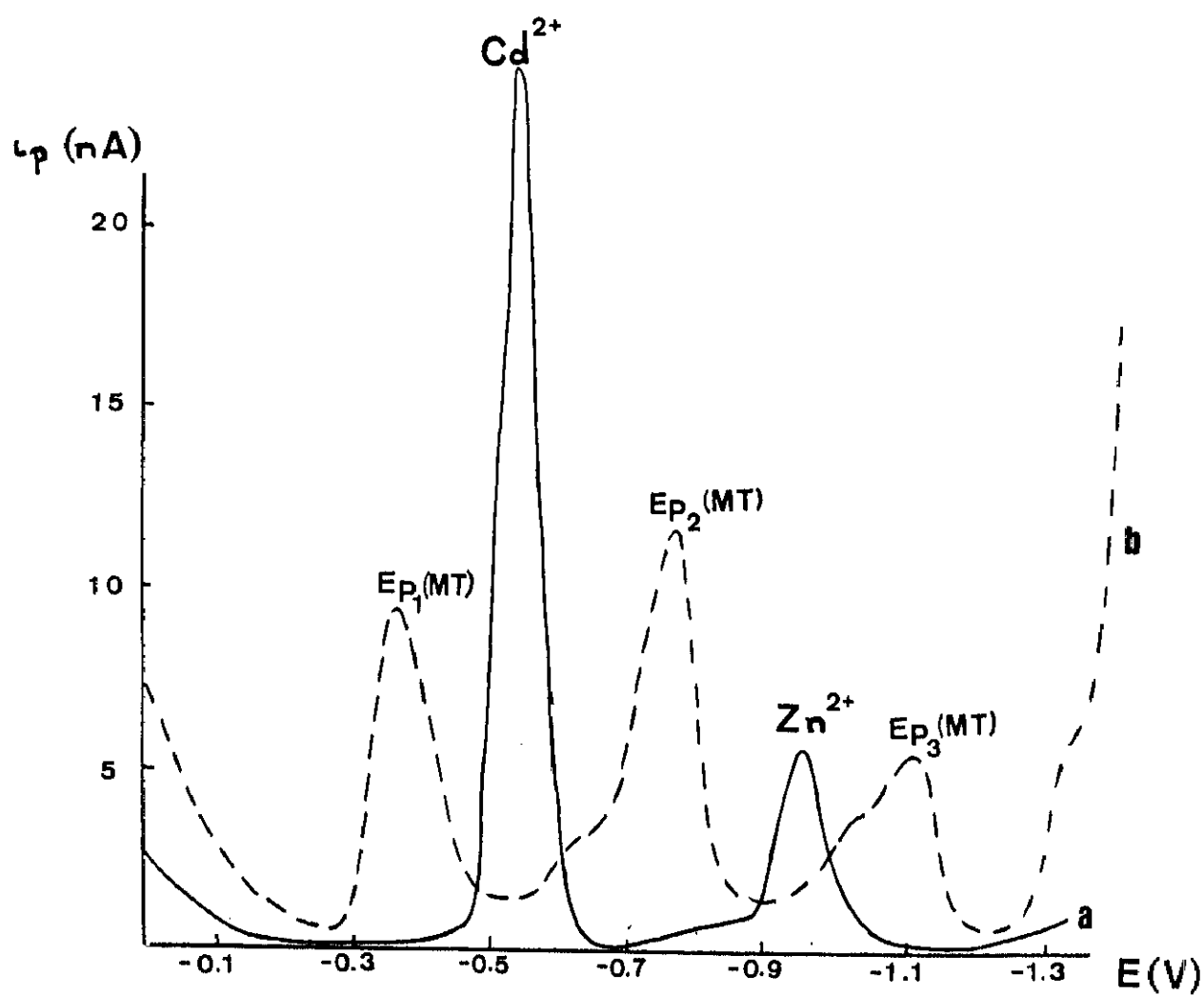


Fig. 81. Polarogramas (D.P.P.) superpuestos de una disolución de $CdCl_2 + ZnCl_2$ (a) y otra de metalotioneína (b) preparadas en TRIS HCl $2.5 \cdot 10^{-2}$ M a pH 7.5.

$E_p(\text{Cd}^{2+}) = -0.58\text{V}$ y $E_p(\text{Zn}^{2+}) = -0.98\text{V}$ son diferentes a los de la MT.

La misma disolución de MT en el mismo medio a pH 2.0, se analiza por polarografía de impulsos diferencial, D.P.P., en las mismas condiciones y se obtiene el polarograma de la figura 82. En él se observan dos picos perfectamente definidos a -0.59V y -1.0V , potenciales que coinciden con los de los cationes cadmio y zinc en su forma libre, Cd^{2+} y Zn^{2+} . Por lo tanto, como ya se indicó en el capítulo III de esta memoria, los dos picos de la MT, $E_{p_1}(\text{MT})$ y $E_{p_3}(\text{MT})$, que aparecen a pH 7.5, desaparecen y se transforman en los picos correspondientes a los cationes cadmio y zinc libres al disminuir el pH hasta 2.0 (fig. 83).

De esta experiencia se puede deducir, en primer lugar, que como ya se ha indicado ampliamente en la literatura (cap. II), a pH ácidos se liberan los cationes asociados a la proteína y se obtiene la información correspondiente a los cationes libres. Hay que señalar que a este pH ácido el primer pico de la MT correspondiente al potencial, $E_{p_1}(\text{MT})$, se mantiene. En segundo lugar, que la respuesta polarográfica de la MT, a pH 7.5, es diferente de la de los cationes libres.

Se ha llevado a cabo un estudio más detallado de la MT en función del pH para valores de este parámetro comprendidos entre 2 y 10. Varios ejemplos significativos de los polarogramas obtenidos se presentan en la figura 84a para pH básicos y 84b para pH ácidos.

En ellos se observa, si se parte de pH básicos y variando el pH hacia valores más ácidos que se produce un desplazamiento de los diferentes picos polarográficos. El pico correspondiente a $E_{p_3}(\text{MT})$ se desplaza hacia potenciales más positivos hasta que alcanza el potencial del catión zinc libre, Zn^{2+} y, alcanzado este valor, se mantiene estable. El valor de pH para el cual $E_{p_3}(\text{MT}) = E_p(\text{Zn}^{2+})$ está comprendido entre 5.5 y 5.0.

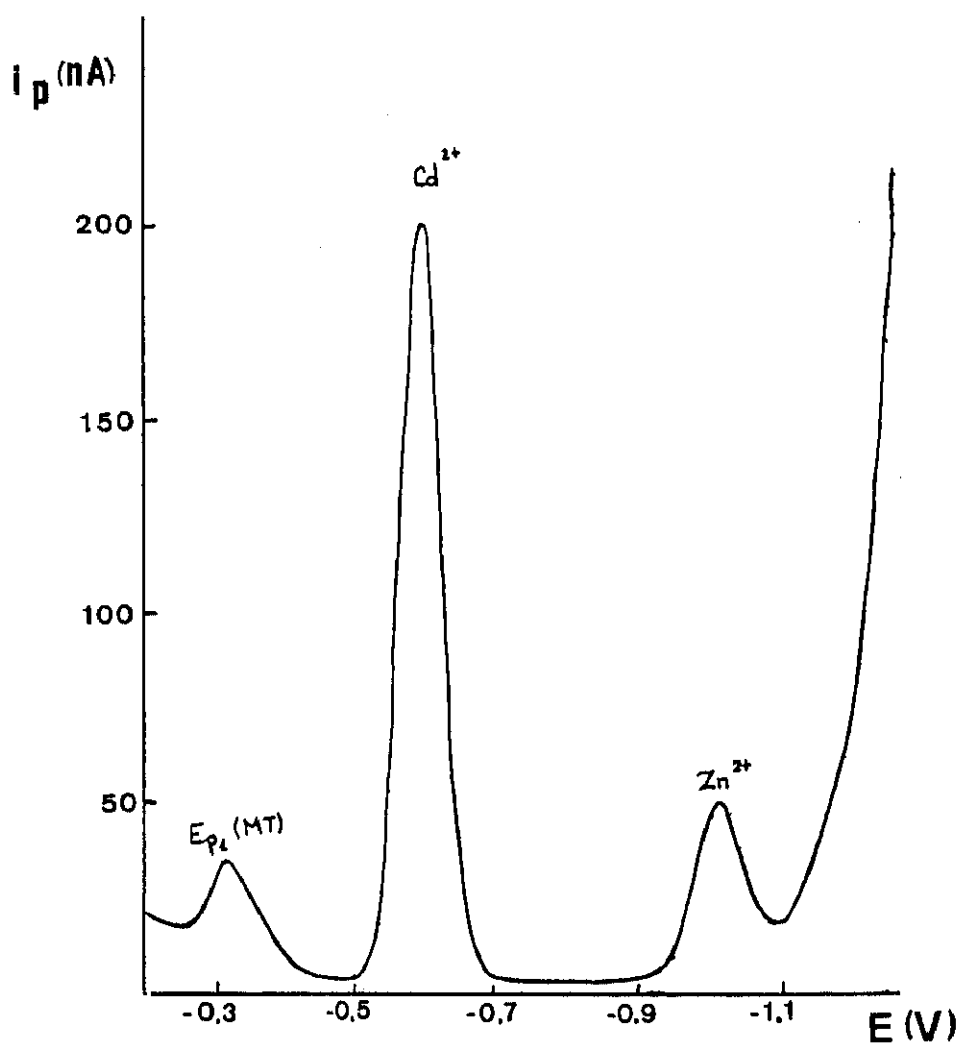


Fig. 82. Polarograma realizado mediante D.P.P. de una disolución de metalotioneína, $1.56 \cdot 10^{-6}$ M, preparada en TRIS HCl $2.5 \cdot 10^{-2}$ M a pH 2.0

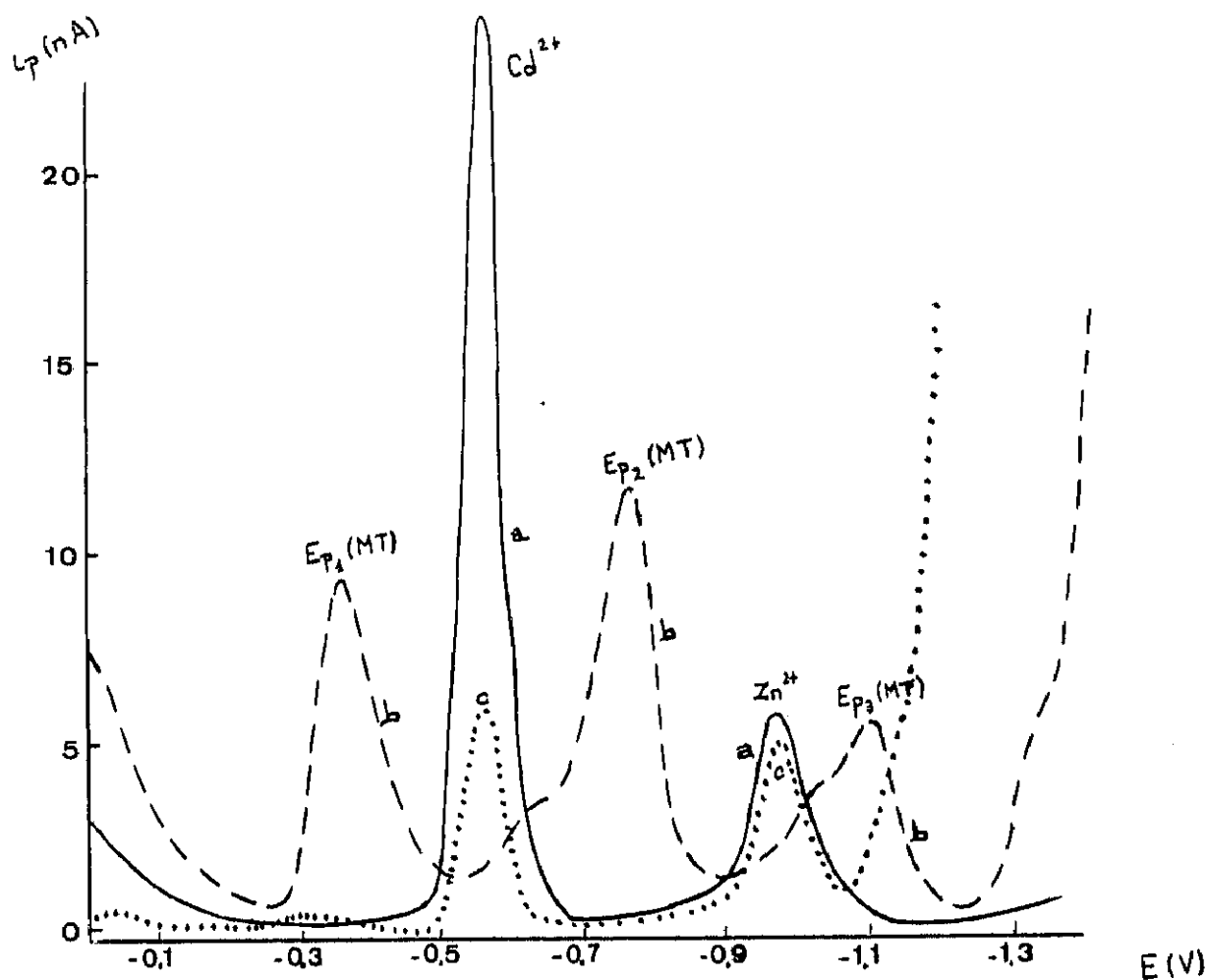


Fig. 83. Polarogramas realizados mediante D.P.P. de: (a) una disolución que contiene $\text{CdCl}_2 + \text{ZnCl}_2$, (b) de una disolución de metalotioneína, $1.56 \cdot 10^{-8} \text{ M}$, preparada en $\text{TRIS HCl } 2.5 \cdot 10^{-2} \text{ M}$ a pH 7.5 y (c) de la misma disolución preparada a pH 2.0.

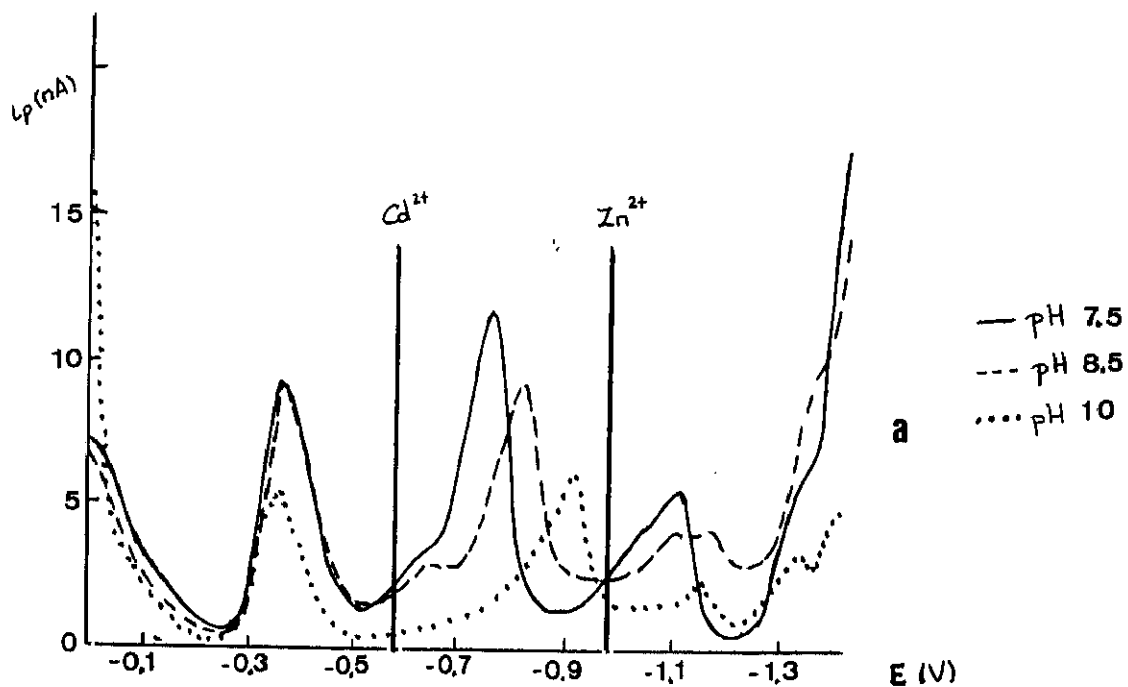
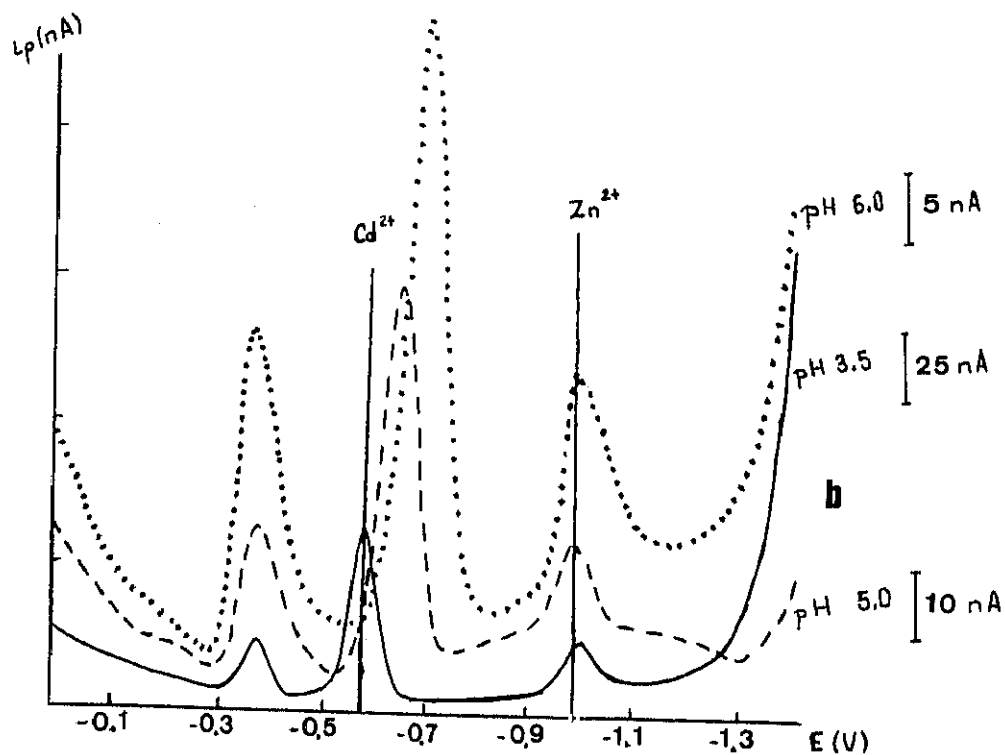


Fig. 84. Polarogramas realizados mediante D.P.P. de una disolución de metalotioneína, $7.69 \cdot 10^{-7}$ M, preparada en TRIS HCl $2.5 \cdot 10^{-2}$ M a diferentes pH: (a) pH básicos y (b) pH ácidos

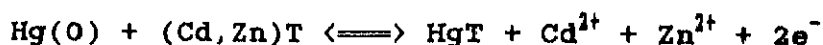


El pico correspondiente a $Ep_1(MT)$ sufre un proceso análogo hasta alcanzar un valor constante correspondiente al valor de reducción del cadmio libre, $Ep_1(MT) = Ep(Cd^{2+})$. Este fenómeno se observa para valores de pH cercanos a 4.0.

En cuanto al primer pico correspondiente al $Ep_1(MT)$ se observa que su potencial permanece invariable en un amplio intervalo de pH, que va de 4 a 10 y que solamente a pHs muy ácidos experimenta un desplazamiento hacia potenciales menos negativos.

A partir de estos resultados obtenidos se pueden formular las siguientes hipótesis que se confirmarán a medida que se desarrolle este capítulo de la memoria.

En el polarograma obtenido para la MT, los dos picos correspondientes a los potenciales $Ep_2(MT)$ y $Ep_3(MT)$ se pueden atribuir a la reducción de los cationes cadmio y zinc, respectivamente, unidos a la proteína, es decir a los complejos Cd-T y a Zn-T. De acuerdo con la ley de desplazamiento de equilibrios los iones complejados se reducen más difícilmente, a potenciales más negativos, que los cationes libres, $-Ep_1(MT) > -Ep(Cd^{2+})$ y $-Ep_3(MT) > -Ep(Zn^{2+})$. Por otra parte, es posible atribuir el primer pico, a potenciales $Ep_1(MT)$, a una reacción electroquímica de los grupos electroactivos de la proteína, probablemente unidos a cationes metálicos. Este proceso electroquímico se ha esquematizado en la introducción de este capítulo y se comentará ampliamente más adelante. Indicamos simplemente, ya que posteriormente se ampliará en la discusión general, que el primer pico se debe a la oxidación del mercurio del electrodo en presencia de metalotioneína y se ve favorecido por la complejación de los grupos tioles de la molécula proteica. En él intervienen las dos constantes aparentes de formación de los compuestos HgT y (Cd,Zn)T.



Como se ha indicado precedentemente, la apotioneína posee grupos funcionales capaces de protonarse y desprotonarse en función del pH de la disolución, por lo que la constante de estabilidad aparente de los complejos dependerá del pH y, por lo tanto, el potencial de los picos atribuidos a la reducción de los cationes ligados a la proteína también se modificará con el pH. Si se admite esta hipótesis como válida, el estudio polarográfico de la reducción de la MT permite determinar los valores de las constantes de complejación aparentes y el posible mecanismo de reducción, de los cationes complejados, en el electrodo.

a) Influencia del pH en los potenciales de reducción, $E_p = f(\text{pH})$

La variación del potencial de semionda para los tres picos en función del pH se representa en la figura 85.

En la variación de $E_{p_1}(\text{MT})$, pico atribuido a la parte orgánica de la MT, se puede observar que el potencial de pico a valores de $\text{pH} \geq 4$ permanece constante, mientras que, para valores de pH menores varía hacia potenciales cada vez menos negativos. Esto indica la existencia de dos formas químicas diferentes, una dependiente del pH, para valores de $\text{pH} > 4.0$. La intersección de las dos rectas nos puede proporcionar un valor indicativo del pK_a de disociación ácido-base del compuesto orgánico. El valor obtenido es $\text{pK}_a = 3.8$. Este valor es muy próximo al obtenido para una (Cd,Zn)-tioneína B de hígado de caballo, $\text{pK}_a = 4.0$ (16) y análogo al obtenido por el método espectrofotométrico descrito ampliamente en el capítulo precedente.

Con respecto a las variaciones de $E_{p_1}(\text{MT})$ y $E_{p_3}(\text{MT})$ atribuidos a los complejos de cadmio y zinc, respectivamente, se puede indicar, como ya se ha señalado, que el pH para el cual se alcanza un valor constante de potencial es menor para el cadmio que para el zinc, lo que permite suponer, cualitativamente, que los complejos de cadmio-tioneína, Cd-T, son más fuertes que los

Fig. Variación de E_p en función del pH

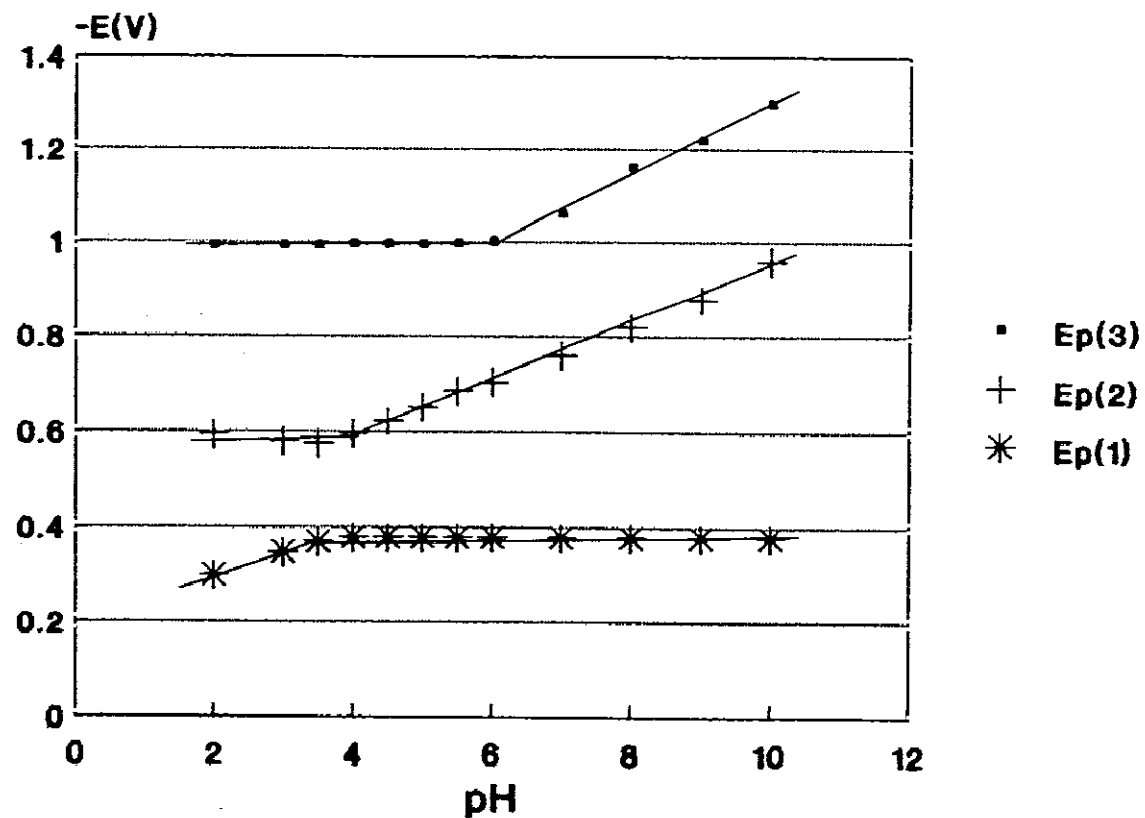
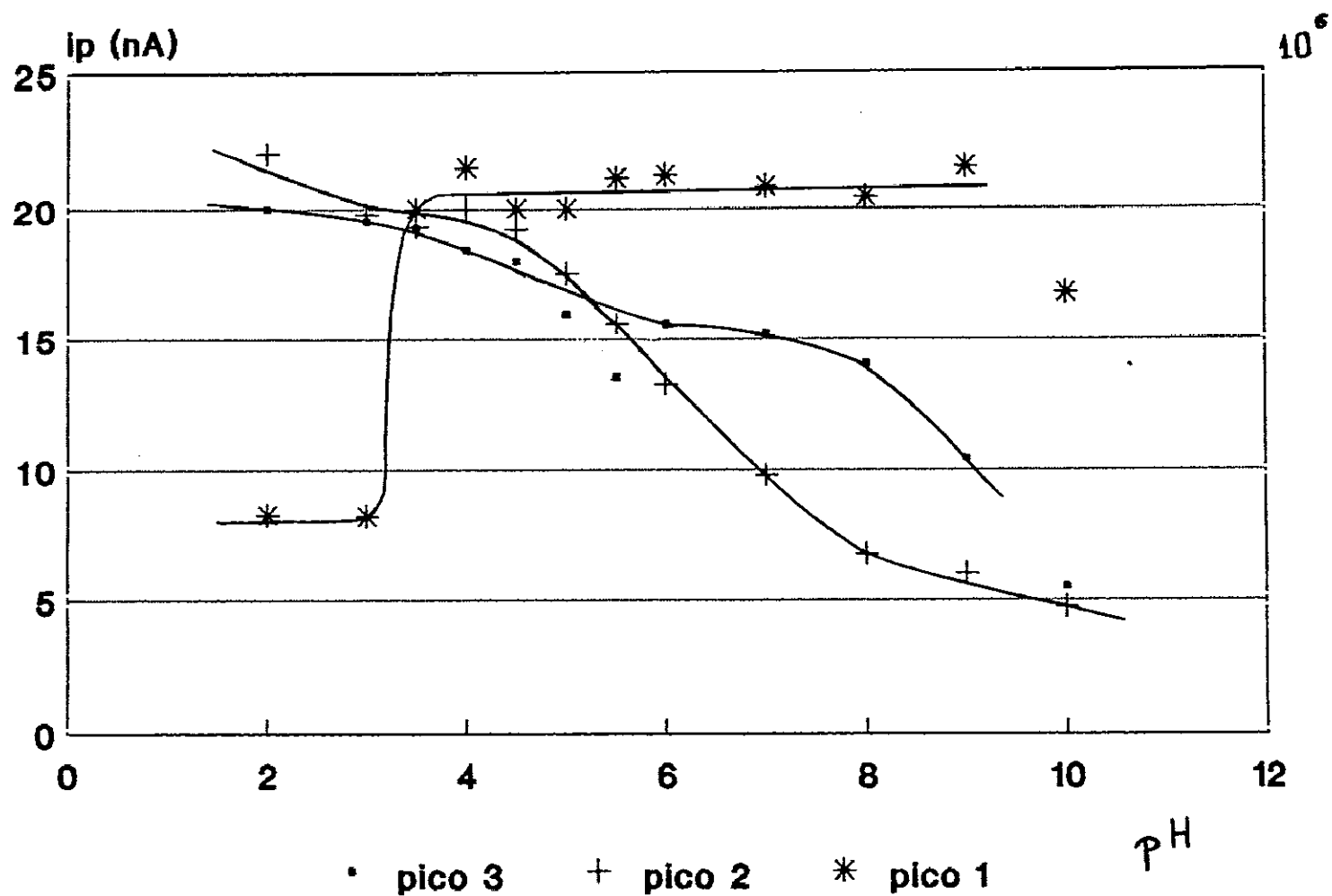


Fig. 85. Representación de la variación del potencial de pico observada en función del pH de la disolución, para cada uno de los pH estudiados en el intervalo de pH de 2-10.

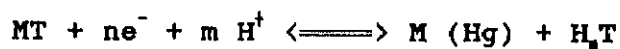
Fig.86. Variación de i_p e i_p/C en función del pH



de zinc-tioneína, Zn-T, ya que es necesario un pH más ácido para romper el complejo y liberar los cationes (fig. 86).

No es posible comparar con lo expuesto en el capítulo anterior, ya que en espectrofotometría de absorción molecular U.V. no se puede diferenciar el momento en que se disocian cada uno de los complejos, cadmio-tioneína y zinc-tioneína, por separado, ya que la onda no está diferenciada para ambos cationes.

De la pendiente de la parte lineal de la representación del potencial de pico para $E_{p_1}(MT)$ y $E_{p_3}(MT)$ en función del pH se puede proponer un mecanismo de reducción. Si se supone que es un sistema electroquímico termodinámicamente reversible, la reducción de los cationes complejados es:



Si se aplica la ley de Nernst:

$$E_k = E_{cte} - \frac{2.3RTm}{nF} pH = E_{cte} - \frac{0.058m}{n} pH \quad (20^\circ C)$$

donde E_k y E_{cte} son potenciales expresados en voltios

m el número de protones

R la constante de los gases perfectos

T la temperatura

F la constante de Faraday

n el número de electrones que intervienen en el proceso

La pendiente teórica $0.058m/n$ es comparable a las obtenidas experimentalmente 0.0579 y 0.0658 para el segundo y tercer picos correspondientes a la MT, para $n=m$. Si se admite la hipótesis de $n=2$, se puede suponer que en el mecanismo de reducción intervienen dos protones.

Por otra parte, la pendiente que corresponde al primer pico, $E_{p1}(MT)$, para $pH > 4$, del orden de 0.03V por unidad de pH, indica que para un proceso electroquímico en el que intervienen dos electrones, $n=2$, (317,327,238) el número de protones implicados en la reacción electroquímica es uno, aunque con el número limitado de puntos que definen la recta, sólo se puede considerar como aproximado.

b) Influencia del pH en la intensidad de pico, $i_p=f(pH)$

A partir del otro parámetro importante en electroquímica, la intensidad de corriente, en D.P.P., la intensidad del pico polarográfico, se puede obtener información cuantitativa acerca de las especies electroactivas. En este caso, como ya se ha indicado, si el proceso electroquímico se rige por las leyes de la difusión estacionaria, en un sistema reversible, la intensidad de corriente es directamente proporcional al coeficiente de difusión de cada especie y al número de electrones que se intercambian en el proceso.

En la figura 86 se representa la variación de la intensidad de cada uno de los picos en función del pH; para el segundo y tercer pico se ha representado la relación entre i_p y la concentración, expresada en molaridad, de cada uno de los cationes contenidos en la MT.

El primer pico presenta una $i_{p1}(MT)$ constante salvo para valores de pH muy ácidos. Por lo tanto, debe ser el mismo compuesto que difunde, por lo que el coeficiente de difusión será el mismo, ya sea apotioneína o la MT. El proceso electroquímico debe ser similar en los dos compuestos, puesto que se ha atribuido a la parte orgánica de la molécula, a la reacción de los grupos tiólicos adsorbidos a la superficie del electrodo. Para valores de pH menores a 3.0, la intensidad de pico es la mitad de la obtenida para valores de $pH > 3$, por lo que se puede suponer que bien, el coeficiente de difusión de la especie

protonada es la mitad que el de la no protonada, hipótesis poco probable o bien se produce una modificación en la molécula de tal manera que el número de electrones que intervienen en el proceso electroquímico es la mitad si se pasa de $\text{pH} > 4$ a otro más ácido. Es posible que el proceso de oxidación del mercurio se modifique a pH ácidos y que se estabilice el grado de oxidación (I), pero no hay datos suficientes para confirmarlo. Por otra parte, se puede considerar que hay cambios estructurales en la propia molécula de tioneína y que el acceso de los grupos tiólicos en la superficie del electrodo se encuentre modificado. Esta última consideración parece avalada por el hecho de que la metalotioneína disociada de su unión a cationes metálicos, pierde la estructura oval y se encuentra desenrollada mostrando los grupos tiólicos hacia el exterior.

En cualquier caso la existencia de dos compuestos diferentes en función del pH se confirma, tanto, a partir de las curvas $E_p = f(\text{pH})$ como de $i_p = f(\text{pH})$.

c) MT r.l. y MT h.k. a pH 7.5 y a pH 2.0. Cálculo de las constantes aparentes de formación de complejos.

Se ha realizado un estudio de las cinco MT a dos pH diferentes 7.5 y 2.0, para observar los paralelismo y/o diferencias entre ellas.

Así a pH igual a 7.5 se obtienen los polarogramas de las figuras 87 y 88 realizadas en las mismas condiciones experimentales y para la misma concentración de producto. Se observa que las cinco MT presentan perfiles análogos, por lo tanto, presentan el mismo tipo de comportamiento, independientemente de su origen.

Cuando se prepara el mismo tipo de disoluciones a pH igual 2.0 se puede comprobar que, en todos los casos, aparecen los picos correspondientes a los cationes libres y el primer pico,

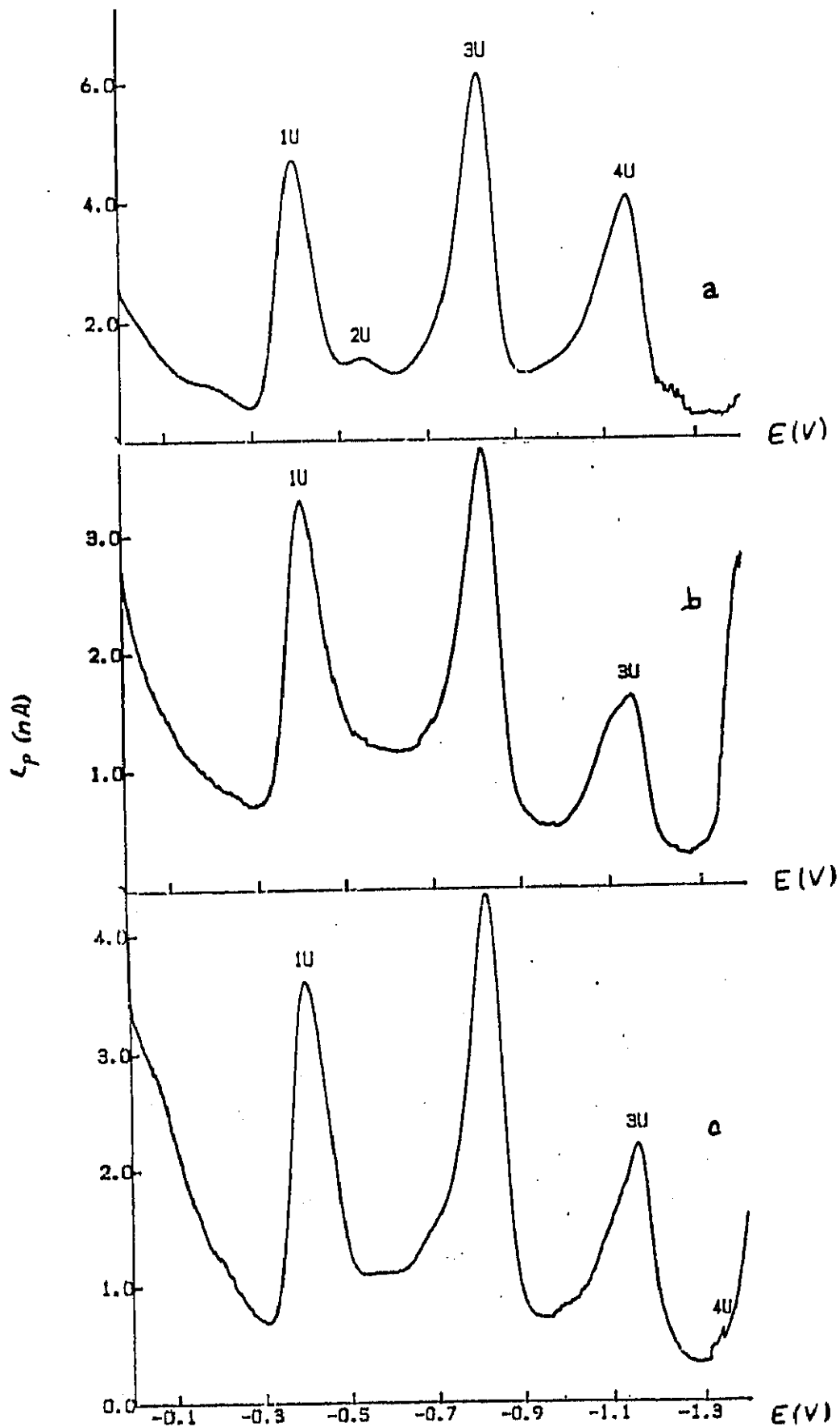


Fig. 87. Polarogramas en D.P.P. de diferentes disoluciones de: (a) MT r.l. M7641 lot.20H9650, (b) MT-I r.l. M5267 lot 129F9575 y (c) MT-II r.l. M5392 lot.79F9510

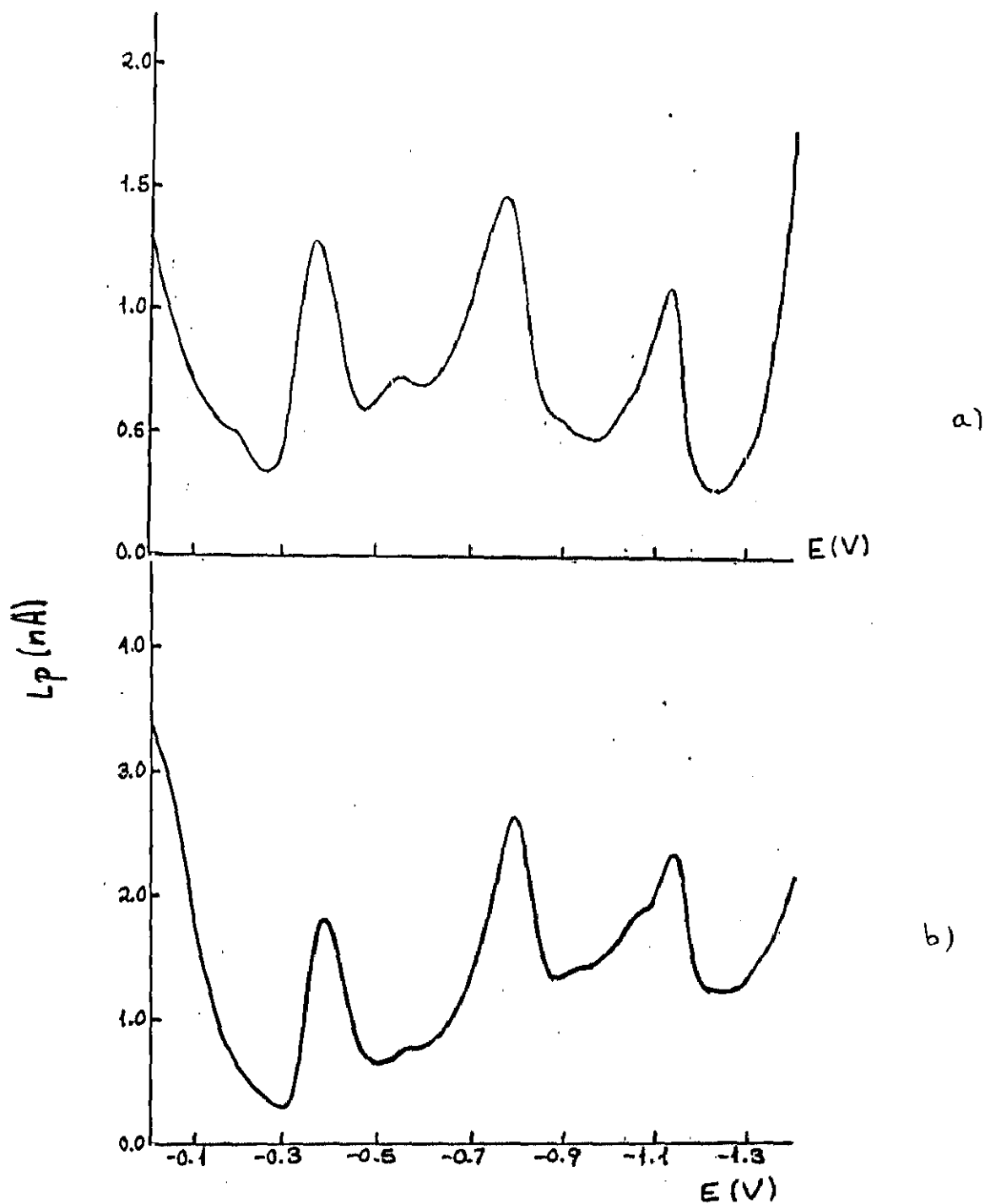


Fig. 88. Polarogramas en D.P.P. de diferentes disoluciones de: (a) MT h.k.. M4766 lot.79F9670, (b) MT h.k. M4766 lot 79F9545 en TRIS HCl $2.5 \cdot 10^{-2}$ M a pH 7.5

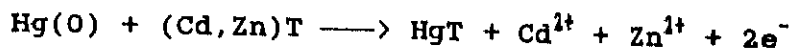
atribuido a los grupos tiólicos de la proteína. No se muestran los polarogramas de las cinco MT a este pH ya que son análogos a los precedentes de la MT r.l. Sin embargo, se indica en la tabla 26 el potencial al cual aparece y la intensidad que presentan para una concentración dada, además de señalar el contenido metálico.

Tabla 26. Potencial e intensidad del primer pico para cada una de las cinco MT comercializadas a una concentración de $7.69 \cdot 10^{-7} \text{M}$. También se indican la C(Cd), la C(Zn) y la relación entre ambas.

HUESTRA	CONTENIDO METALICO			pH = 2.0		pH = 7.5	
ORIGEN	$C(\text{Cd})$ $\times 10^{-7}$	$C(\text{Zn})$ $\times 10^{-7}$	$C(\text{Cd}/\text{Zn})$	$E_{p1}(\text{MT})$ (V)	$i_{p1}(\text{MT})$ (nA)	$E_{p1}(\text{MT})$ (V)	$i_{p1}(\text{MT})$ (nA)
MT h.k.	20.08	12.86	1.56	-0.298	7.40	-0.362	13.07
MT h.k.	15.65	6.80	2.30	-0.302	4.53	-0.390	9.44
MT r.l.	37.00	10.10	3.66	-0.306	9.26	-0.400	22.57
MT-I r.l.	28.97	8.46	3.42	-0.304	6.48	-0.406	14.3
MT-II r.l.	32.00	7.66	4.57	-0.308	7.40	-0.406	14.4

De los datos de la tabla se puede indicar que el potencial del primer pico, $E_{p1}(\text{MT})$, permanece practicamente constante. Existe una ligera variación que parece depender de la relación existente entre cadmio y zinc, Cd/Zn. Presentan un potencial más negativo las MT que tienen mayor valor de la relación $C_{\text{Cd}}/C_{\text{Zn}}$. Existe además una relación entre el contenido metálico y la respuesta polarográfica, i_p . Esto parece indicar que los cationes unidos a los grupos tiol de la MT intervienen en el proceso electroquímico que corresponde al primer pico atribuido a la oxidación del mercurio en presencia de metalotioneínas.

En efecto, como se ha indicado anteriormente, según el mecanismo propuesto por nosotros:



el potencial de la reacción depende de $E_0[\text{Hg(II)}/\text{Hg(0)}]$, de la constante K_{HgT} y de la K_{CdZnT} .

$$E' = E_0 - 0.03 (\log K_{\text{HgT}} - \log K_{\text{CdZnT}})$$

Si K_{CdZnT} , que no se puede evaluar es mayor cuanto mayor sea el contenido de cadmio, ya que $K_{\text{CdT}} > K_{\text{ZnT}}$, el término: $\log K_{\text{HgT}} - \log K_{\text{CdZnT}}$ será menor y E' será más próximo de E_0 , por lo tanto el potencial del primer pico de la metalotioneína, $E_{p1}(\text{MT})$ será menos negativo.

La relación entre la i_p del primer pico a pH igual a 2.0 y a 7.5 para las cinco MT, en las mismas condiciones (tabla 27) es cercana a 0.5 en todos los casos, lo que indica que la respuesta polarográfica de la MT a pH 7.5 es el doble de la correspondiente a las mismas MT a pH 2.0, como ya se ha indicado para la MT r.1.

Tabla 27. Relación entre las intensidades del primer pico a pH 2.0 y pH 7.5 para las cinco MT.

TIPO DE MT	$i_{p1}(\text{pH}2.0)/i_{p1}(\text{pH}7.5)$
MT h.k. M4766 lot.79F9670	0.6
MT h.k. M4766 lot.28F9545	0.53
MT r.1. M7641 lot. 20H9650	0.41
MT-I r.1. M5267 lot.129F4575	0.495
MT-II r.1. M5392 lot.79F9510	0.555

Las dos especies existentes que producen la señal del primer pico a pH mayor y menor de 4.0 presentan, aparentemente, un comportamiento electroquímico diferente.

d) Cálculo del valor de las constantes de asociación, K_{MT}

A partir de las medidas de potencial realizadas a pH 7.5 y 2.0 se pueden evaluar las constantes aparentes de estabilidad de los complejos Cd-T y Zn-T.

A partir de la relación que corresponde al proceso de reducción de un complejo:

$$E = E_1^0 + \frac{0.058}{n} \log \frac{[MX]_{el}}{[M(Hg)]_{el} [X]_{el}}$$

donde n es el número de electrones

[XM] el complejo

[M(Hg)] el metal amalgamado en el electrodo

[X] la especie complejante

que se puede expresar como:

$$\Delta E = \frac{0.058}{n} (pK_a + \log [X]_s)$$

si $[X] = cte$

$$\Delta E_h = \frac{0.058}{n} pK_a$$

sustituyendo obtendremos los valores de las constantes aparentes de estabilidad que se muestran en la tabla 28. Se observa que los valores obtenidos son muy similares para las cinco MT, siendo los complejos de cadmio mucho más fuertes que los de zinc, con la proteína. Estos datos están en perfecta concordancia con los

datos de afinidad obtendios del estudio realizado para la MT r.l. en función del pH y los de la literatura (11,12,31,100,103).

Tabla 28. Constantes aparentes de estabilidad de las metalotioneínas de cadmio y zinc comercializadas

MUESTRAS	C A D M I O		Z I N C	
NATURALEZA	$E(E_{CdT}-E_{Cd})$ en V	pK' Cd-T	$E(E_{ZnT}-E_{Zn})$ en V	pK' Zn-T
HORSE KIDNEY MT lot. 79F9670	0.220	7.586	0.156	5.379
HORSE KIDNEY MT lot. 28F9545	0.238	8.207	0.168	5.793
RABBIT LIVER MT lot. 20H9650	0.254	8.759	0.168	5.93
RABBIT LIVER MT-I lot. 129F9575	0.260	8.966	0.172	5.931
RABBIT LIVER MT-II lot. 79F9510	0.256	8.828	0.178	6.138

pK' se determinó a pH 7.5

$$E_{Cd} = -0.554 \text{ V}$$

$$E_{Zn} = -0.972 \text{ V}$$

$$\Delta E = \frac{0.058 \cdot pK'}{n}$$

Análogamente se ha efectuado el cálculo de las constantes de formación de complejos con cadmio y zinc de la metalotioneína

"rabbit liver" en función del pH, de los resultados experimentales expuestos, anteriormente, en este apartado. Los resultados se muestran en la tabla 29.

Tabla 29. Constantes aparentes de estabilidad de la MT r.l. en TRIS·HCl $2.5 \cdot 10^{-4}M$ a diferentes pH

MUESTRAS: MT r.l.	C A D M I O		Z I N C	
pH del MEDIO	$E(E_{CdT}-E_{Cd})$ en V	pK' Cd-T	$E(E_{ZnT}-E_{Zn})$ en V	pK' Zn-T
4.0	0.046	1.40	0.026	----
4.5	0.072	2.45	0.026	----
5.0	0.098	3.55	0.026	----
5.5	0.136	4.65	0.029	----
6.0	0.160	5.30	0.035	1.05
7.0	0.214	7.00	0.087	3.00
7.5	0.255	8.80	0.168	5.80
8.0	0.267	9.20	0.186	6.40
9.0	0.328	11.30	0.249	8.60
10.0	0.406	14.00	0.330	11.35

La representación de pK_{CdT} y pK_{ZnT} en función del pH se da en el figura 89. En ambos casos se observa una variación lineal $pK = f(pH)$. Esta variación ilustra lo expuesto anteriormente. Por una parte, los complejos de cadmio son, para todo pH, más estables que los de zinc y la destrucción del complejo de cadmio se origina a pH más bajos que para zinc ($y=0$) 3.5 para Cd-T y 5.5 para Zn-T.

Se ilustra, así mismo, la influencia del pH en el proceso de complejación. Cabe señalar que las pendientes son similares en ambos casos 2 y 2.5 para Cd-T y Zn-T respectivamente pero no idénticos, lo que podría indicar que los complejos metal-tioneína

$pK'(Cd-T)$ y $pK'(Zn-T)$ en función del pH

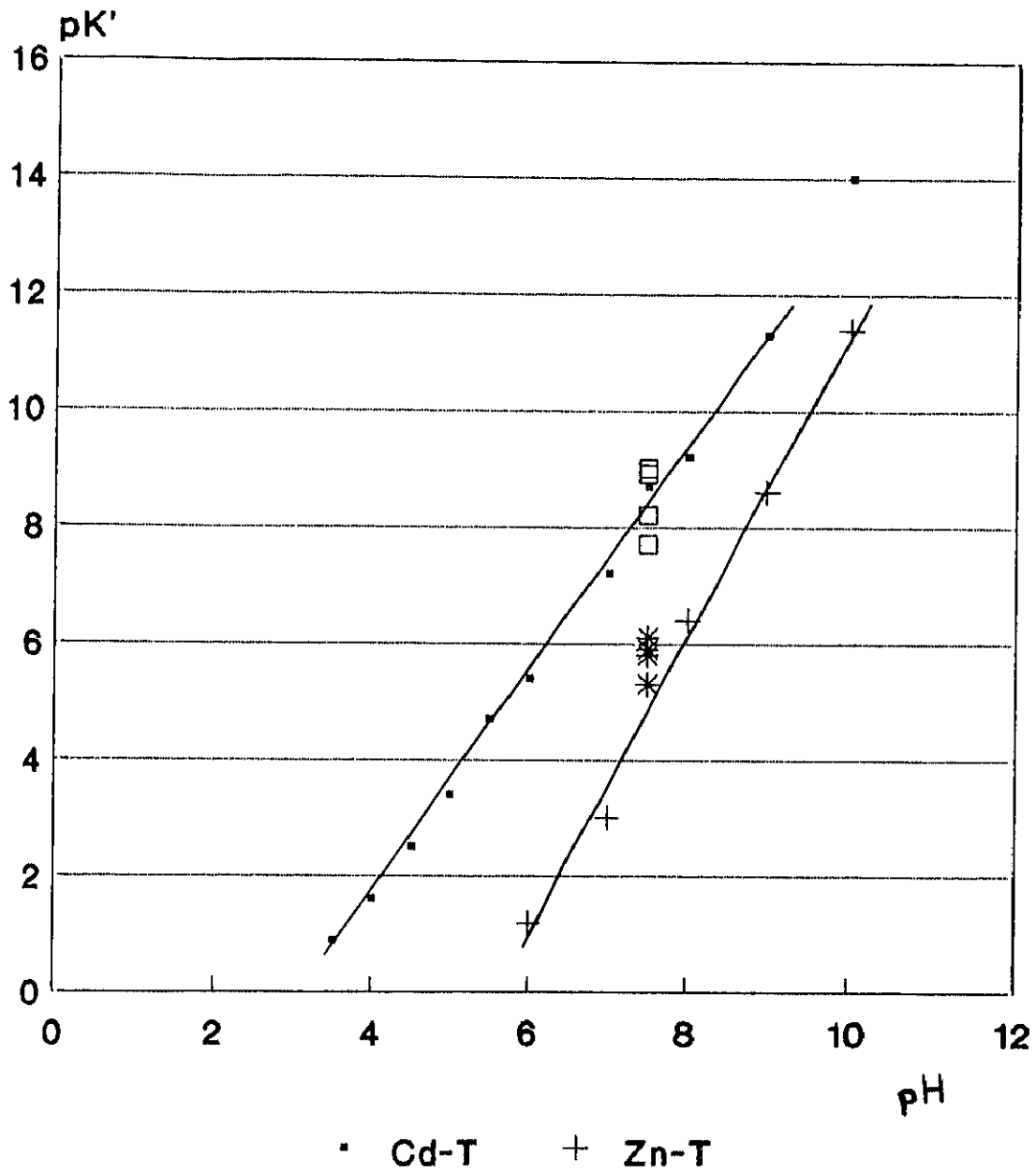


Fig. 89. Variación de $pK'(Cd-T)$ y $pK'(Zn-T)$ en función del pH del medio.

son de diferente naturaleza para cada uno de los cationes. Resultados análogos se han indicado por otros autores (334) con relación a un tripéptido sintético capaz de complejar cadmio y zinc. La diferencia existente en la complejación entre cadmio y zinc puede ser debida a que en el complejo de zinc además de los grupos tiólicos entran a formar parte los grupos amino.

e) Medio fosfato

Se ha realizado el estudio de una de las MT en medio fosfato tamponado para, así, poder comparar con los resultados obtenidos en el medio TRIS y ver la influencia de los mismos.

Se utiliza la MT r.l. en un medio tampón fosfato pH 7.4. La MT presenta en este medio, al igual que en TRIS·HCl, tres picos bien definidos, aunque algo desplazados hacia potenciales más negativos.

En la figura 90a se muestra uno de los polarogramas obtenidos en medio fosfato. En este medio la señal debida al electrolito fondo es menor y los tres picos están mejor definidos, en particular el tercer pico, atribuido al complejo de zinc, ya que en medio fosfato el dominio de electroactividad del disolvente es mayor.

Analogamente al caso descrito precedentemente, a pH 2.0, los cationes se liberan del enlace con la proteína. A partir de la diferencia de potencial del pico debido al catión complejoado y al catión libre, se pueden evaluar las constantes aparentes de formación de complejos.

En la tabla 20 se comparan los valores obtenidos en los dos medios estudiados. Se observa que la secuencia de constantes de cadmio y zinc es análoga en los dos medios, el complejo de cadmio es más estable como cabía esperar. Por otra parte las constantes aparentes de formación son mayores para los dos cationes en medio

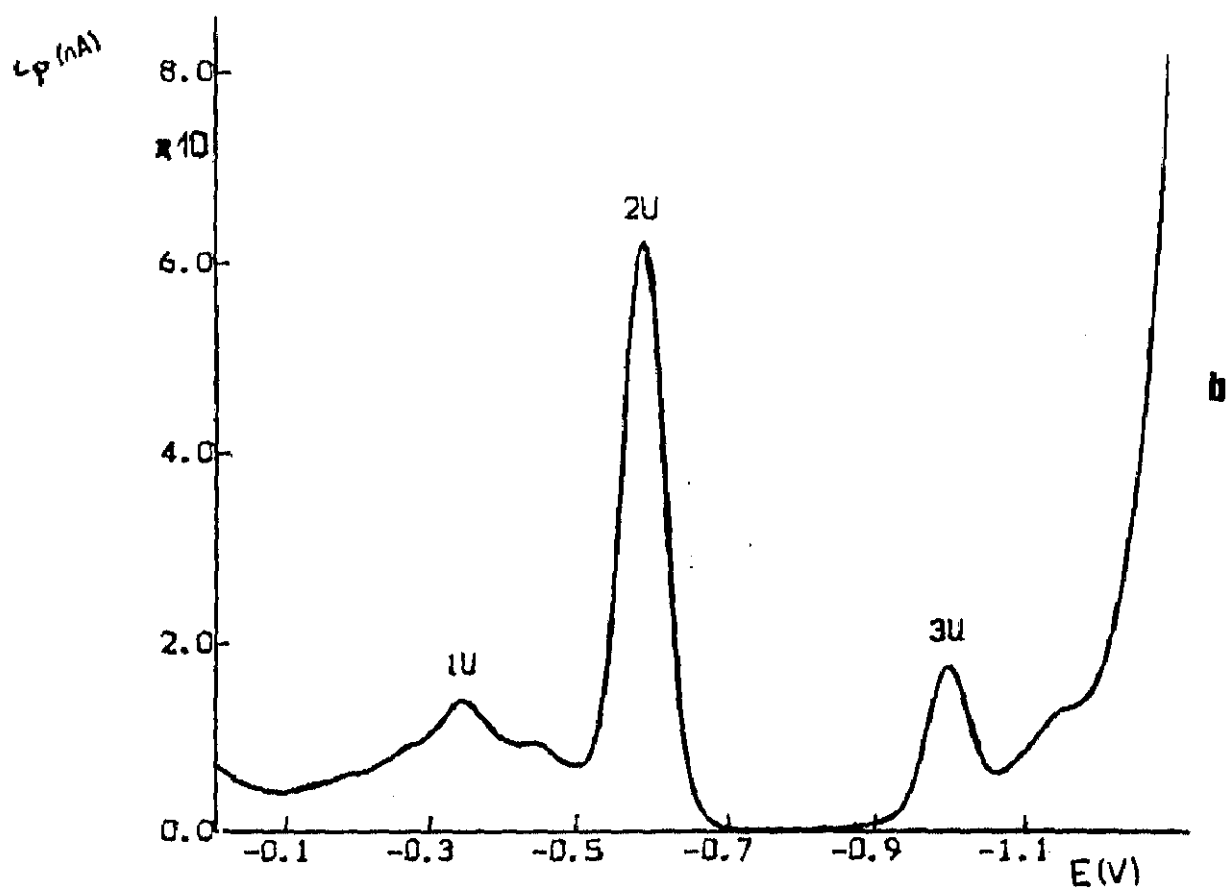
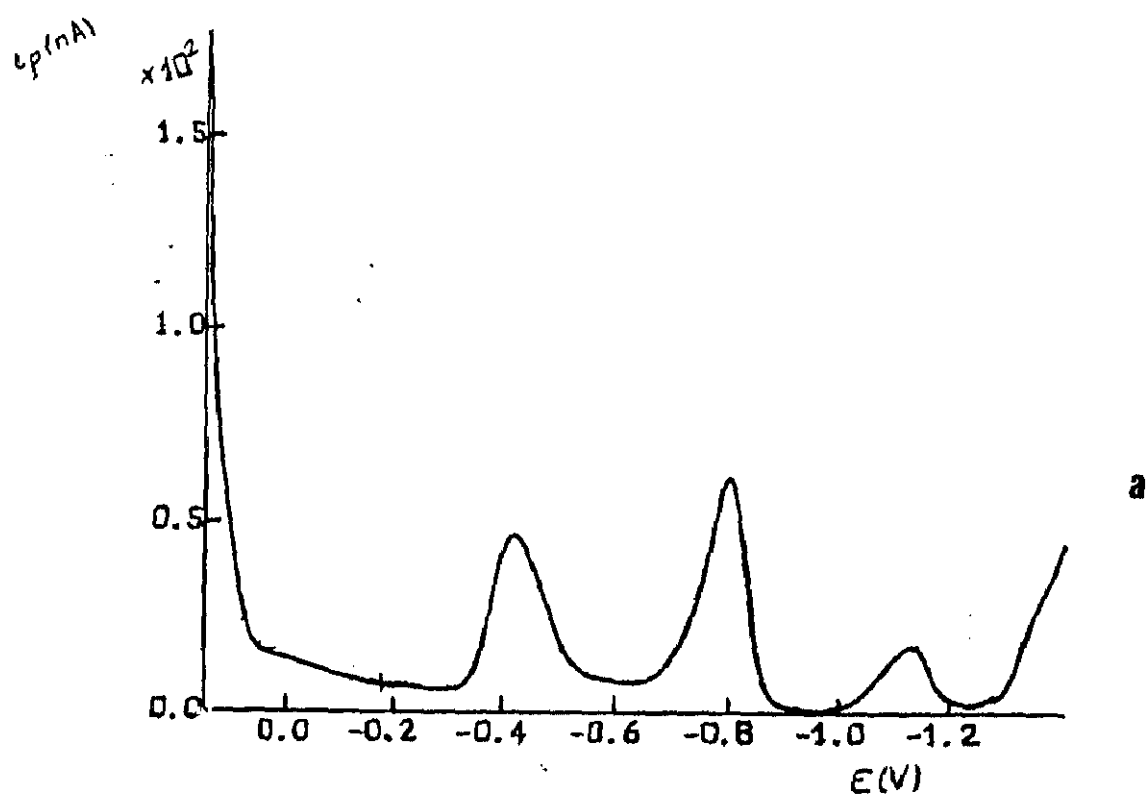


Fig. 90. Polarogramas en D.P.P. de una disolución de HT r.l. $1.5 \cdot 10^{-8}$ M preparada en tampón fosfato $4 \cdot 10^{-2}$ M a dos pH diferentes: (a) pH 7.4 y (b) pH 2.0

TRIS; parece, por lo tanto, que este medio ejerce una influencia sobre la estabilidad de los complejos formados.

En espectrofotometría UV, el medio fosfato también proporciona una mejor resolución de los perfiles espectrales, con un menor ruido de fondo.

Tabla 20. Constantes aparentes de estabilidad de la MT-II r.l. M5392 lot.79F9510 en dos medios diferentes

M E D I O	C A D M I O		Z I N C	
pH = 7.4	$E(E_{CdT}-E_{Cd})$ en V	pK' Cd-T	$E(E_{ZnT}-E_{Zn})$ en V	pK' Zn-T
TRIS·HCl	0.256	8.828	0.178	6.138
FOSFATO	0.212	7.31	0.130	4.48

V.C.1.B. DETERMINACION DE LOS PARAMETROS ELECTROQUIMICOS CARACTERISTICOS n Y D.

Con el fin de conocer las características de los sistemas electroquímicos responsables de los picos polarográficos se ha realizado un estudio, por polarografía clásica y por polarografía de impulsos diferencial, que permite obtener información con respecto al número de electrones que se intercambian durante la reacción electroquímica y sobre la magnitud del coeficiente de difusión de las especies. Para ello es necesario partir de la hipótesis, como ya se ha indicado, que el proceso está regido por la difusión estacionaria, sin que los probables procesos de adsorción en el electrodo de mercurio sean los preponderantes.

a) Polarografía clásica

a₁) Cálculo del número de electrones

La relación entre la intensidad y el potencial está dada por la ley de Nernst que se ha aplicado con anterioridad. Así para una reducción:

$$E = E_k + \frac{RT}{\alpha nF} \ln \frac{i_d - i}{i}$$

donde R es la constante de los gases perfectos

T es la temperatura

n es el número de electrones que intervienen en el proceso

F es la constante de faraday

i_d es la intensidad límite

i es la intensidad a un potencial dado

E y E_k son potenciales en voltios

Para un fenómeno reversible, $\alpha=1$; para uno no-reversible, los valores de α están comprendidos entre 0 y 1.

La representación gráfica de $\log (1/(i_d-i))$ en función de $-E$ debe ser una línea recta cuya pendiente, $\alpha n/0.059$, permite calcular el valor de αn y la intersección con el eje de las x da el valor del potencial de semionda, E_k (343).

a₁₁) Medio TRIS HCl

La experiencia se ha realizado a pH 7.5 y a pH 2.0 con el fin de comparar los valores obtenidos de los tres picos resultantes para cada una de las MT de los cationes complejados y de los cationes libres. Un ejemplo de los polarogramas obtenidos por polarografía clásica a los pH indicados se representan en la figura 91.

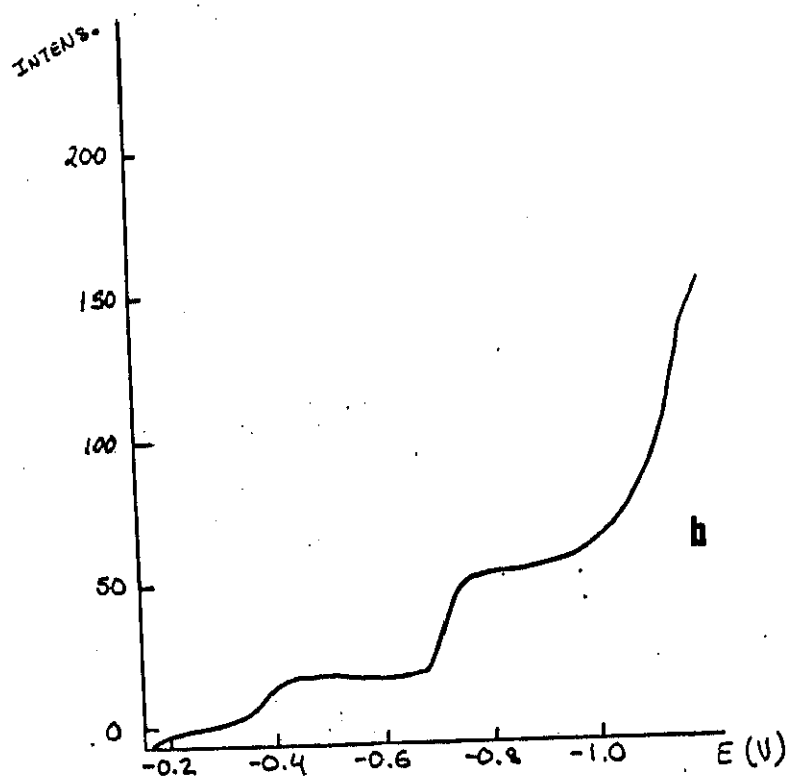
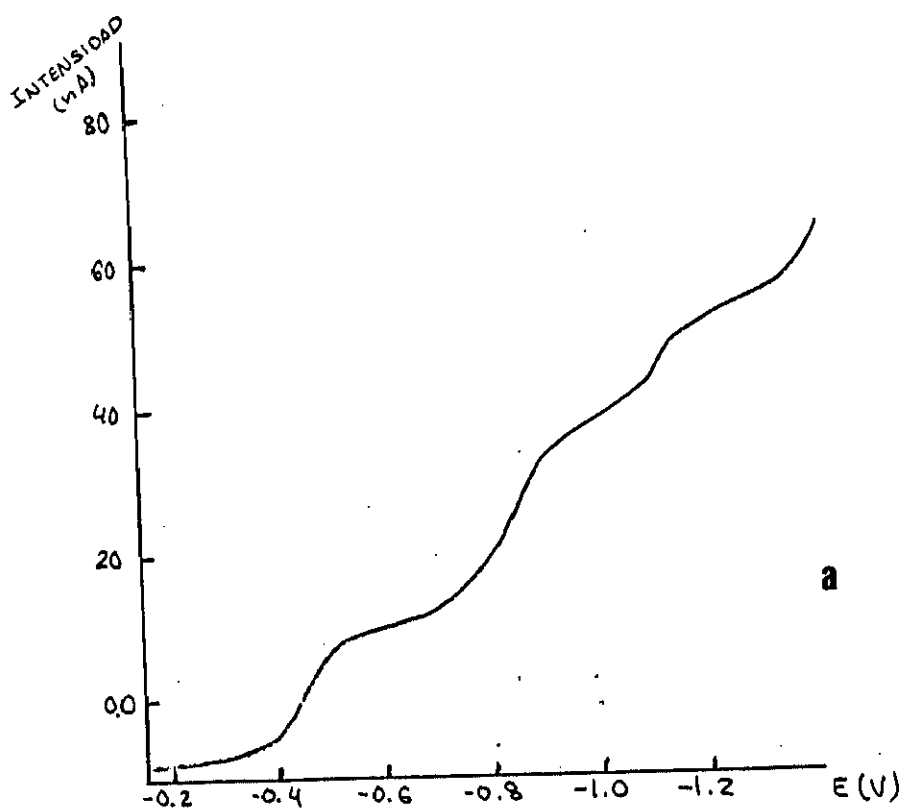


Fig. 91. Perfiles de polarografía clásica de una disolución de MT r.l. preparada en TRIS HCl $2.5 \cdot 10^{-2}$ M a dos pH diferentes: (a) pH 7.4 y (b) pH 2.0

La representación del logaritmo de la relación de intensidades en función del potencial se ilustra en la figura 92 para las ondas obtenidas. Hay que señalar que la onda correspondiente a la reducción del zinc libre a pH 2.0 está mal definida ya que, en este caso, el dominio de electroactividad del disolvente está limitado por la reducción de los protones procedentes del medio ácido y la onda correspondiente al zinc no se puede ver. Como se puede observar se han obtenido representaciones lineales. Los valores de αn se agrupan en la tabla 21. Como cabía esperar αn para el cadmio a pH ácidos es igual a 2. Para los otros compuestos el valor de αn es siempre menor a 2.

Tabla 21. Valores de αn para cada una de las ondas polarográficas a pH 2.0 y 7.5 de la MT r.l. M7641 lot.20H9650 en TRIS-HCl $2.5 \cdot 10^{-4} M$

PARAMETRO	pH = 2.0		pH = 7.5		
	1º Pico	Cd ²⁺	1º Pico	Cd-T	Zn-T
αn	1.29-1.53 1.454	1.90-2.09 2.02	1.05-1.18 1.12	0.70-1.05 0.83	0.85-1.07 0.98

Es importante señalar que αn para el primer pico es mayor en medio ácido que en medio neutro, lo que implica que, para una misma concentración de MT la intensidad correspondiente al primer pico debería ser mayor a pH 2.0, en contradicción con lo expuesto precedentemente en la variación de la intensidad del primer pico en función del pH (fig. 90). Por lo tanto, para explicar este comportamiento es necesario suponer el hecho de que la proteína (compuesto orgánico) se encuentre protonada en medio ácido lo que modifica el proceso electroquímico en el electrodo y que la señal debida a la proteína en presencia de cadmio y/o zinc está exaltada, bien porque se producen fenómenos de adsorción, aunque a esta concentración deben predominar los de difusión estacionaria, o bien porque se forma una amalgama de los metales

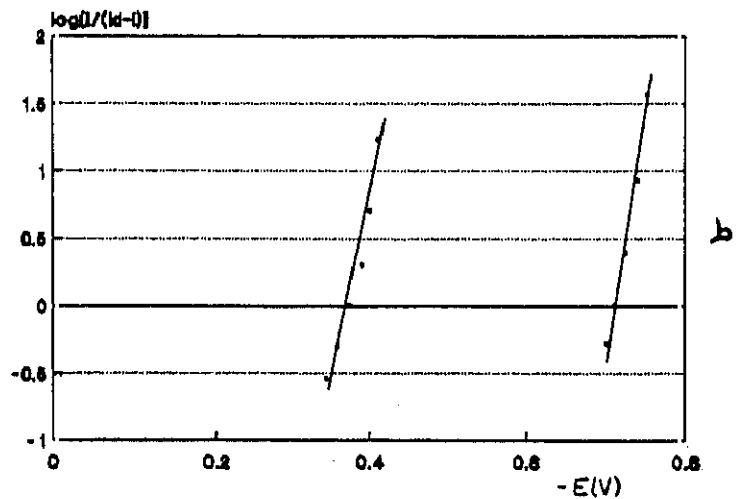
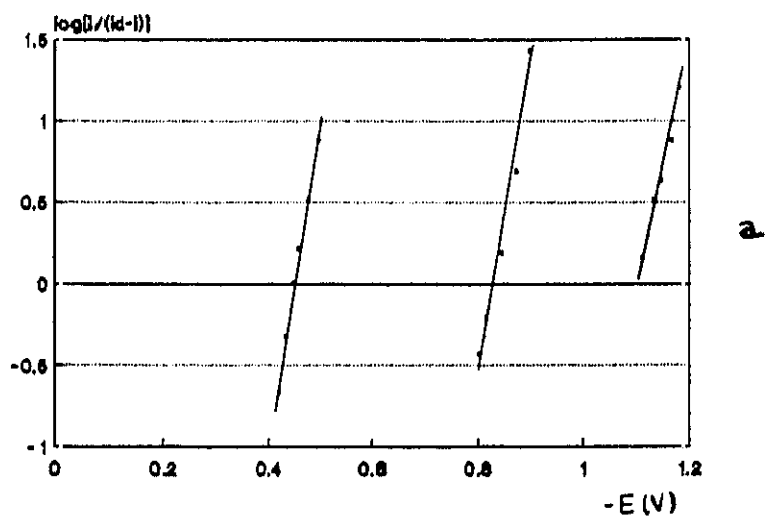


Fig. 92. Representación gráfica de $\log[i/(i_a - i)]$ para cada uno de los picos obtenidos a partir de una disolución de MT preparada en TRIS HCl $2.5 \cdot 10^{-2}$ M a dos pH diferentes: (a) pH 7.4 y (b) pH 2.0

en el electrodo dificultando así el contacto entre la parte orgánica de la molécula y el electrodo.

a₁₂) Medio fosfato

Se ha realizado un estudio análogo al anterior en medio fosfato. Se obtienen los polarogramas de la figura 93. Como se puede comprobar existen máximos polarográficos, por lo que, cuando, a partir de la ecuación de Nernst, se trate de representar el $\log(i/(i_d-i))$ en función del valor del potencial (fig. 94) para calcular αn , de forma similar a como se ha realizado precedentemente, sólo será explotable el primer pico.

Como se puede comprobar en la tabla 22, en la que se representan los valores de αn a los dos pH estudiados, el valor de αn para el primer pico, próximo a uno es igual para los dos pH estudiados y análogo al obtenido precedentemente en el medio TRIS HCl. Parece significativo que αn esté comprendido, en ambos medios, entre uno y dos para el primer pico atribuido a la oxidación del mercurio en presencia de grupos tioles, lo que refleja la ambigüedad existente con respecto al grado de oxidación del mercurio.

Tabla 22. Valores de αn para cada una de las ondas polarográficas a pH 2.0 y 7.5 de la MT r.l. M7641 lot.20H9650 en Fosfato $4 \cdot 10^{-4}M$

PARAMETR	pH = 2.0		pH = 7.5		
	1ºPico	Cd ²⁺	1ºPico	Cd-T	Zn-T
αn	0.95-1.15 1.06	1.29-1.38 1.32	0.99-1.27 1.15	0.89-1.11 0.989	0.97-1.16 1.04

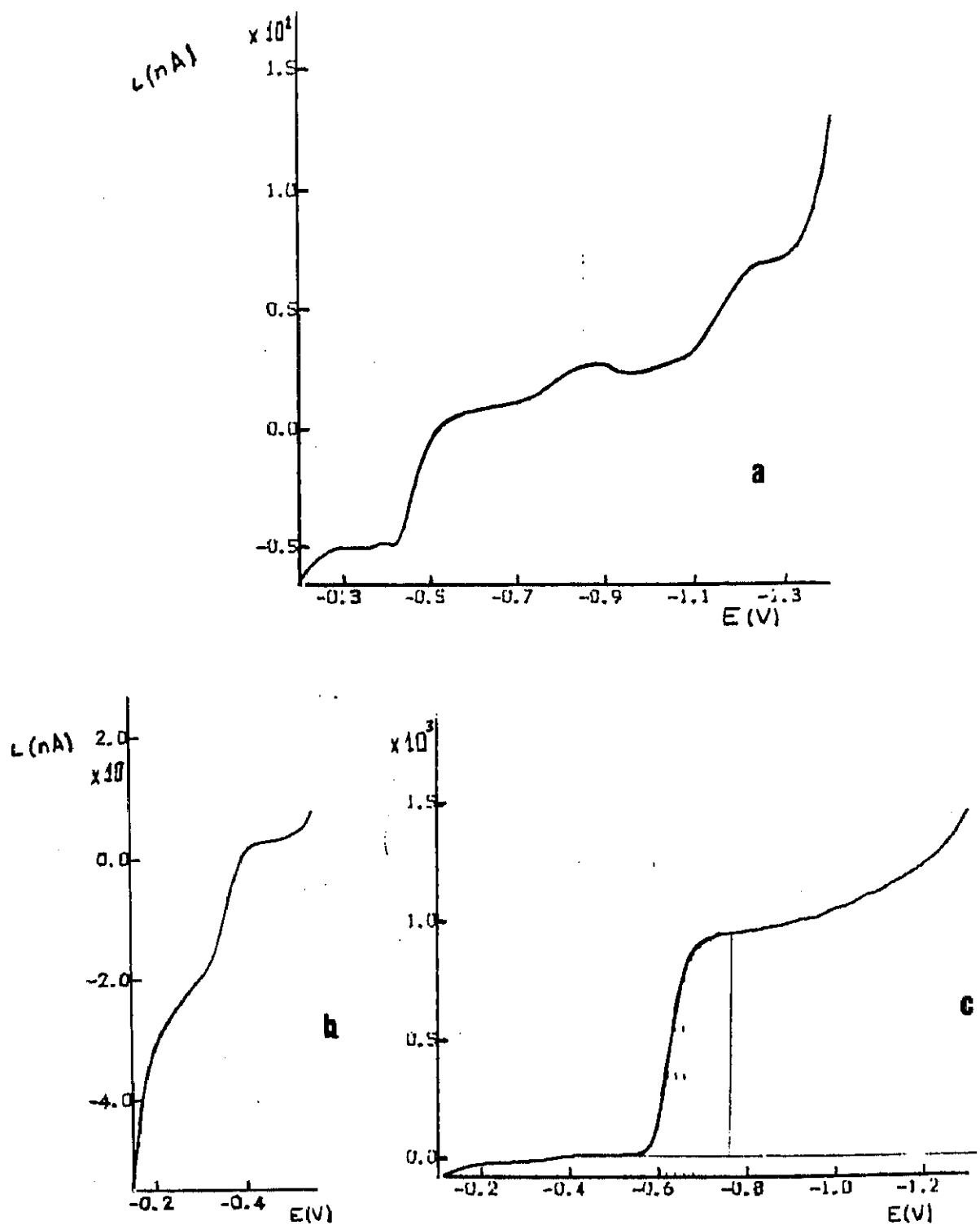


Fig. 93. Polarografía clásica obtenida a partir de una disolución de MT preparada en fosfato 4.0×10^{-2} M a dos pH diferentes: (a) pH 7.4 y (b) pH 2.0

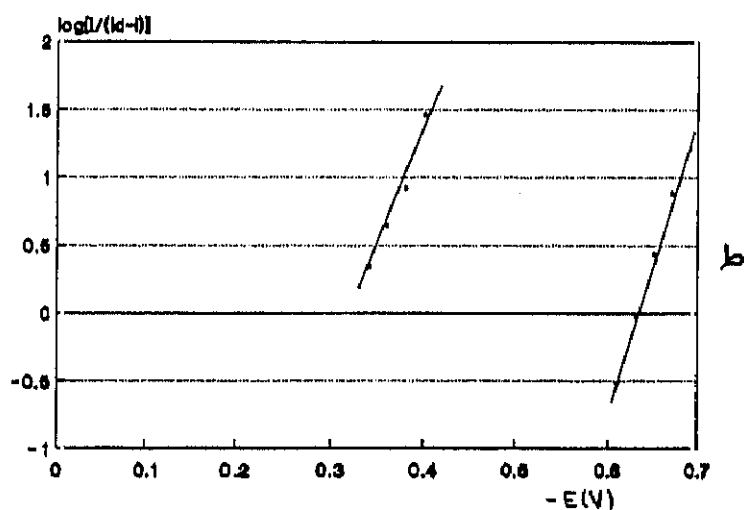
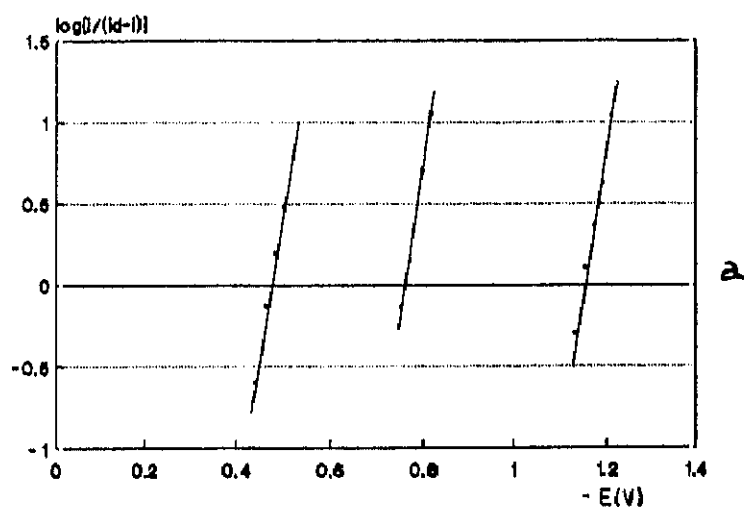


Fig. 94. Representación gráfica de $\log[i/(i_a - i)]$ para cada uno de los picos obtenidos a partir de una disolución de MT preparada en fosfato $4.0 \cdot 10^{-2} M$ a dos pH diferentes: (a) pH 7.4 y (b) pH 2.0

a₂) Cálculo del coeficiente de difusión, D.

A partir de los polarogramas y si se admite lo indicado previamente, fenómeno rápido debido a la difusión estacionaria, se puede aplicar la ecuación de Ilkovic para evaluar las relaciones existentes entre los coeficientes de difusión, D, para cada uno de los picos a diferentes pHs.

$$i_1 = 605 n D^{1/2} C m^{2/3} t^{1/6}$$

Al realizar la relación entre pH=7.5/ pH=2.0, se obtiene que $i_1(\text{pH}=7.5)/i_1(\text{pH}=2)$ es igual a $[n \cdot D^{1/2}]_{7.5}/[n \cdot D^{1/2}]_2$, considerando que n es el mismo a los dos pHs estudiados, podemos decir que la relación de intensidades límite a los dos pH es igual a la relación entre la raíz cuadrada de los coeficientes de difusión.

$$i_1(7.5)/i_1(2.0) = D^{1/2}(7.5)/D^{1/2}(2.0)$$

Los resultados obtenidos se agrupan en la tabla 23, para los dos medios, TRIS y fosfato.

Tabla 23. Relación existente entre los coeficientes de difusión obtenidos a los dos pHs, 7.5 y 2.0, para cada uno de los dos medios, TRIS HCl y fosfato.

M E D I O	PRIMER PICO	SEGUNDO PICO
FOSFATO	$D^k(7.5)=0.935 D^k(2)$	$D^k(7.5)=0.01 D^k(2)$
TRIS HCl	$D^k(7.5)=0.79 D^k(2)$	$D^k(7.5)=0.51 D^k(2)$

En todos los casos, cualitativamente el coeficiente de difusión del segundo pico de la metalotioneína a pH 7.5 es menor que el coeficiente de difusión a pH 2.0 que corresponde al catión cadmio libre, lo que cabía esperar. En relación a los resultados obtenidos para el primer pico en medio TRIS el coeficiente de difusión es aproximadamente igual a los dos pHs estudiados, lo

que puede indicar que la especie responsable de la reacción electroquímica, tiene el mismo tamaño a ambos pHs. Esto es lógico puesto que se ha supuesto que el responsable de dicha señal es la tioneína protonada o ligada a cationes metálicos.

En medio fosfato se encuentra una relación análoga con respecto al primer pico $D^{1/2}(\text{pH}=7.5)=D^{1/2}(\text{pH}=2.0)$. Sin embargo el coeficiente de difusión para el segundo pico es 100^2 lo que es difícilmente explicable, salvo por el hecho de que en este medio se observan máximos polarográficos que incluyen en la respuesta.

b) Polarografía de impulsos diferencial (D.P.P.)

b₁) Cálculo del número de electrones, n

Se ha utilizado, por otra parte, la D.P.P. para obtener información complementaria sobre los parámetros electroquímicos.

Para amplitudes de impulso pequeñas y en un sistema totalmente reversible regido por la difusión estacionaria la intensidad es, según Parry y Osteryoung:

$$i_p = \frac{n^2 F^2 A C}{4 R T} \frac{D^{1/2}}{\pi t} \Delta E$$

en donde n es el número de electrones

F y π son constantes

C es la concentración

D es el coeficiente de difusión

A el area de la gota del electrodo de mercurio

t_p el tiempo transcurrido desde que se impone el impulso hasta que se lee la señal

$i_{\text{máx.}}$ es la intensidad máxima de corriente

Se han representado las intensidades de cada uno de los picos a pH igual a 7.5 y 2.0 en función de ΔE . Se han elegidos

estos dos pH, pH=7.5 en el que los cationes están unidos a la proteína y pH=2.0 donde se encuentran en forma de cationes libres, con el fin de poder comparar los parámetros polarográficos y las características de los diferentes compuestos (fig. 95 y 96).

Se puede comprobar que a pH 7.5 los tres picos siguen una evolución análoga, es decir, existe una relación lineal entre i_p y ΔE hasta que al alcanzar 80 mV de amplitud de impulso se alcanza una meseta, es decir, se estabiliza la señal.

La evaluación de la anchura de pico a la semialtura del pico polarográfico en D.P.P. depende de la amplitud del impulso que se superpone. La representación teórica de esta variación se presenta en la figura 97; se observa que la forma de la curva depende del número de electrones que intervienen en el proceso, que la curva $w_{1/2} = f(\Delta E)$ se separa más de la bisectriz cuanto menor es el número de electrones, n . La comparación de los resultados experimentales con las curvas teóricas permiten evaluar n para cada uno de los sistemas electroquímicos. En la figura 98 se representan las curvas obtenidas experimentalmente. Se observa que para pH 7.5, en los tres compuestos las curvas experimentales se aproximan a las teóricas para el valor de $n=1$. Para pH 2.0 la única curva experimental que se puede comparar con una teórica es la correspondiente al segundo pico, es decir, al catión cadmio libre para un valor de $n=2$.

Estos resultados obtenidos por una técnica diferente están en buena concordancia con los obtenidos precedentemente por polarografía clásica.

b₁) Cálculo del coeficiente de difusión, D.

El cálculo del coeficiente de difusión se realizó a partir de la experiencia anteriormente citada para el cálculo del número de electrones en polarografía diferencial de impulsos.

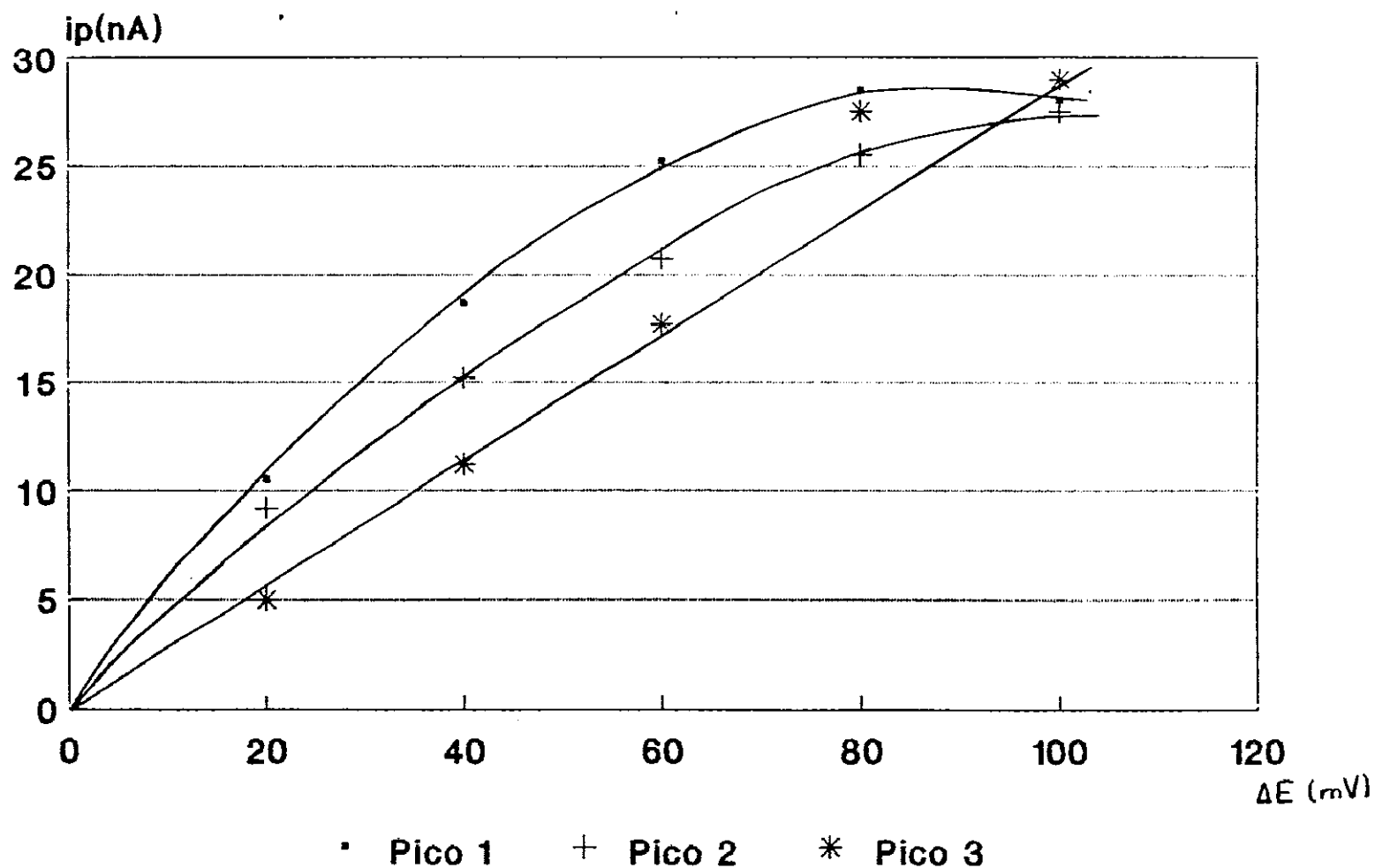


Fig. 95. Representación de la intensidad de pico para cada uno de los picos obtenidos de una disolución de MT preparada en TRIS HCl $2.5 \cdot 10^{-2}$ M a pH 7.5

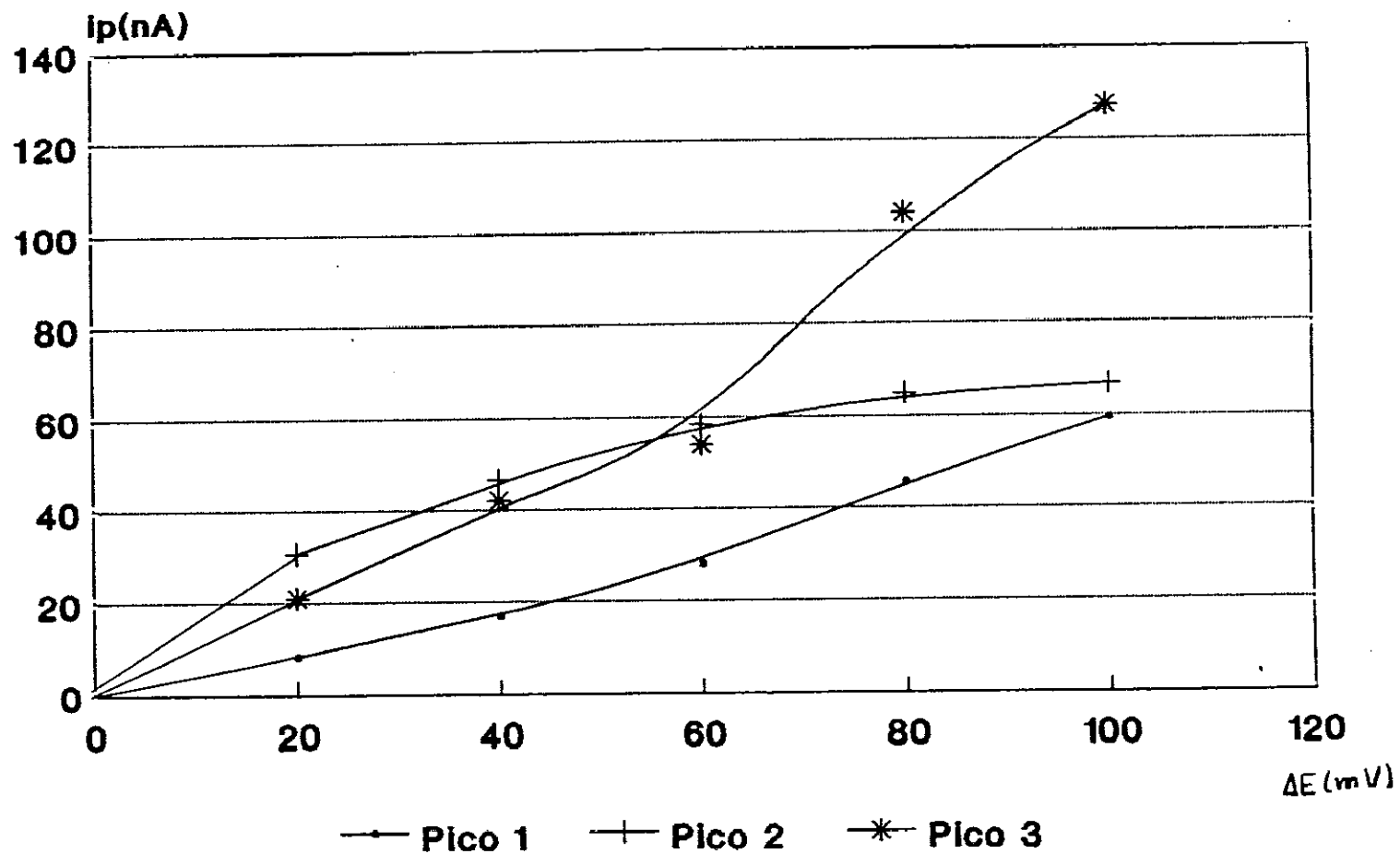


Fig. 98. Representación de la intensidad de pico para cada uno de los picos obtenidos de una disolución de MT preparada en TRIS HCl $2.5 \cdot 10^{-2}$ M a pH 2.

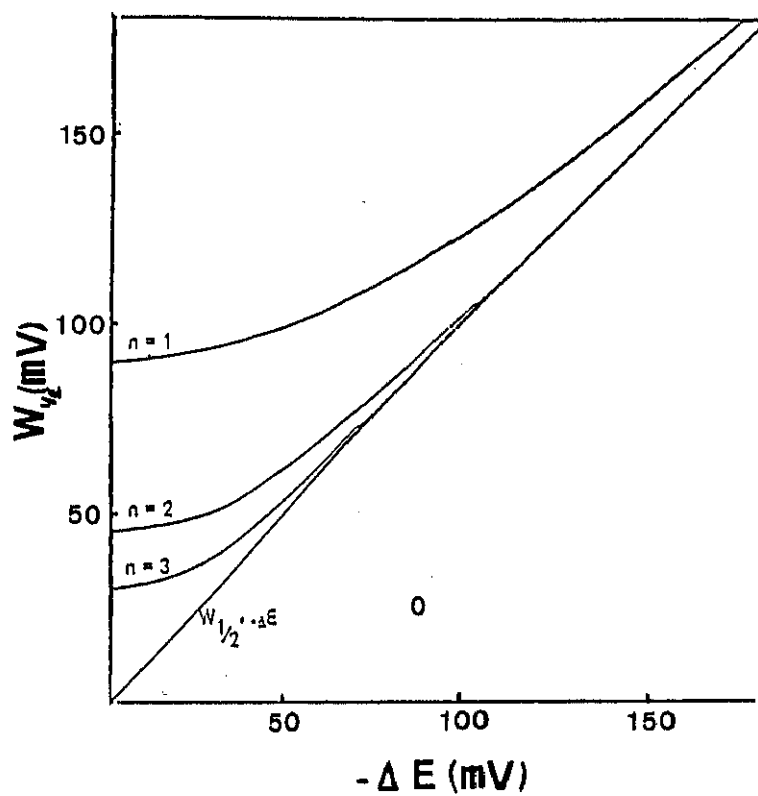


Fig. 97. Representación teórica de la anchura a la semialtura de pico en función de la amplitud de impulso.

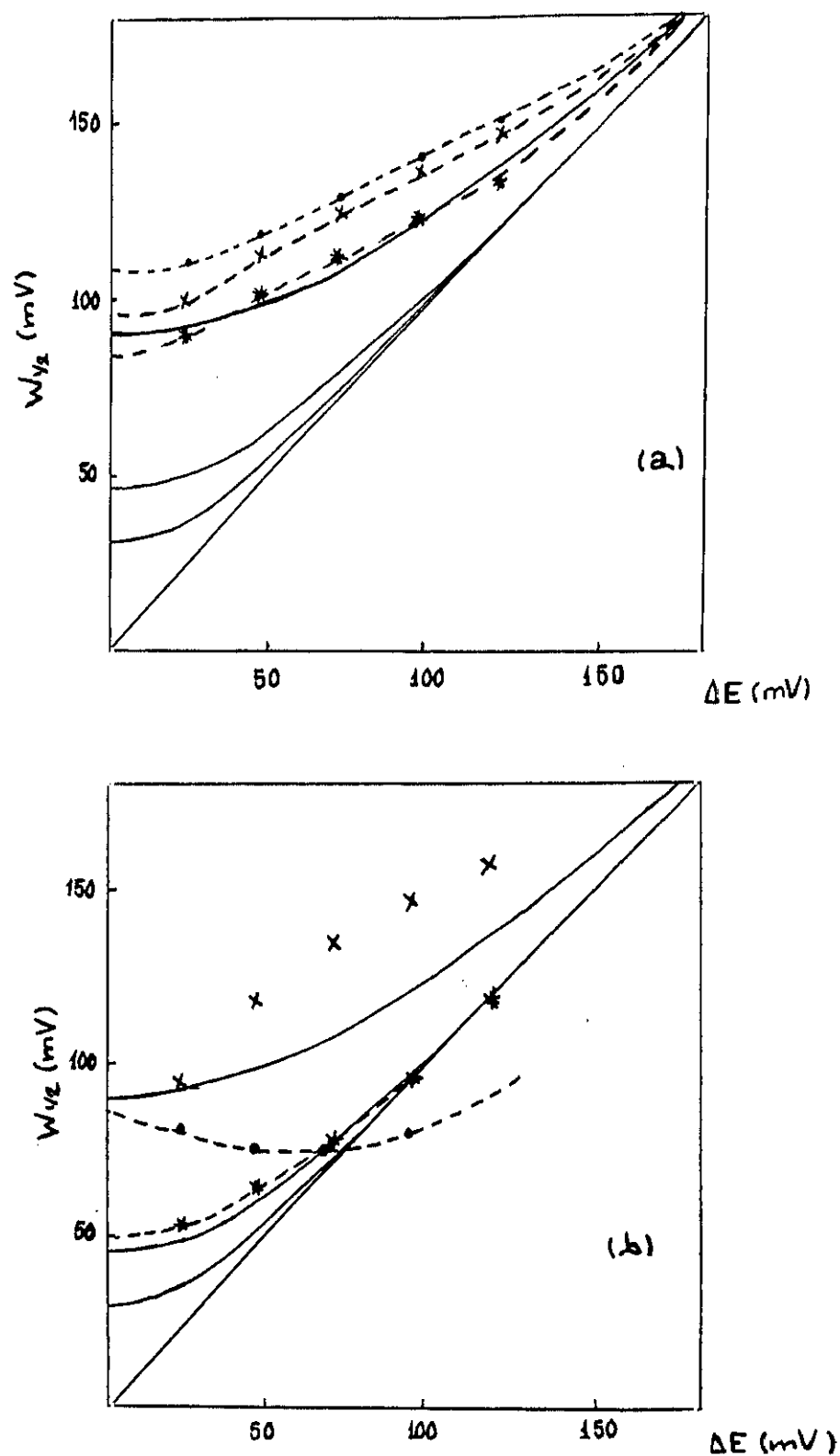


Fig. 98. Representación de la anchura a la semialtura de los tres picos en función de la amplitud de impulso: (•) primer pico, (*) segundo pico y (x) tercer pico, de la metalotioneína a dos pH diferentes (a) pH 7.5 y (b) pH 2.

A partir de las representaciones de la ecuación de Parry y Osteryoung a pH 7.5 y 2.0 que se muestran en las figuras 95 y 96 se puede obtener el valor del coeficiente de difusión a cada uno de los pH estudiados.

El valor de la pendiente de la recta será igual a:

$$b = \frac{n^2 F^2 A C}{4 R T} \frac{D^{1/2}}{\pi t}$$

donde los valores F,R,T y π son constantes. Por lo tanto,

$$b = \text{cte} \frac{n^2 A C}{t^{1/2}} D^{1/2}$$

los valores del área de la gota, A, tiempo de goteo, t, así como la concentración de la muestra son iguales a los dos pH estudiados. De esta manera si lo que se estudia es la relación entre las pendientes a ambos pH, los únicos parámetros que pueden variar en función de la especie que difunda son n y D. La ecuación puede quedar como sigue:

$$[a] \quad \frac{b_{7.5}}{b_{2.0}} = \frac{\text{cte} \frac{n_{7.5}^2 A C}{t^{1/2}} D_{7.5}^{1/2}}{\text{cte} \frac{n_{2.0}^2 A C}{t^{1/2}} D_{2.0}^{1/2}} = \frac{n_{7.5}^2 D_{7.5}^{1/2}}{n_{2.0}^2 D_{2.0}^{1/2}}$$

Al sustituir los valores de las pendientes obtenidas de la zona lineal de la representación a ambos pH para cada uno de los picos, se obtienen los siguientes valores de relación de coeficientes de difusión.

Tabla 24. Valores de n y de b (pendiente de la recta) para los picos estudiados a pH 7.5 y 2.0.

O N D A	p H = 7.5		p H = 2.0	
	$n_{7.5}$	$b_{7.5}$	$n_{2.0}$	$b_{2.0}$
ASOCIADA AL				
1° PICO	1.1	0.42	1.5	0.58
2° PICO	1.0	0.315	2.0	0.70
3° PICO	1.01	0.40	---	1.35

Los valores obtenidos experimentalmente de n y b para cada uno de los picos a cada pH fueron los indicados en la tabla 24.

Al sustituir estos valores en la ecuación [a] se obtienen las siguientes relaciones entre los coeficientes de difusión a pH 7.5 y 2.0:

a) para el primer pico $D_{7.5}^k = 1.34 D_{2.0}^k$

b) para el segundo pico $D_{7.5}^k = 1.8 D_{2.0}^k$

Sin embargo, se puede decir que los coeficientes de difusión correspondientes a cada uno de los picos es diferente para los dos pH estudiados, por lo que podría decirse que las especies que difunden son diferentes en función del pH del medio. Esto es coherente en el caso del segundo pico, ya que como ya se ha indicado a pH ácido la especie que difunde son los cationes libres, mientras que a pH 7.5 es el cadmio complejoado con la metalotioneína. Para el primer pico cabría esperar que ambos coeficientes fuesen similares, ya que éste se atribuyó a la reducción de los grupos tiólicos existentes en las MT, sin embargo, parece que el metal influye en el proceso electroquímico, cuando a pH básicos se encuentra ligado.

Los resultados expuestos en este apartado, en relación a la determinación de n, número de electrones y D, coeficiente de

difusión, se pueden considerar como aproximados, puesto que la hipótesis de la que se parte, es decir, que la ecuaciones propuestas para un régimen de difusión estacionaria, es simple y que, en el caso estudiado de un fenómeno complejo, estas ecuaciones probablemente no sean adecuadas para describir el proceso. Este tipo de ecuaciones son las únicas existentes que relacionan los parámetros que intervienen en un proceso.

V.C.1.C. ADICIONES PATRON

Se ha considerado interesante el estudio de la evolución de los polarogramas de las metalotioneínas, en un medio dado, cuando se añaden los mismos cationes, como cationes libres, que los que inicialmente existen ligados a la metalotioneína. Con este estudio se puede obtener información sobre la estabilidad de los propios complejos MT y la posibilidad de desplazamiento de un catión por otro. En efecto, si se tienen en cuenta los valores de las constantes aparentes de asociación, en un medio dado, determinadas en el apartado precedente, se ha observado que, para todos los valores de pH el complejo de cadmio es más estable que el correspondiente, al zinc, por lo que se puede suponer, que si el equilibrio está regido solamente por parámetros termodinámicos, el cadmio podría desplazar al zinc inicialmente fijado en la metalotioneína.

Se parte de una disolución de MT "rabbit liver" a una concentración dada y se añaden progresivamente cantidades crecientes de cationes CdCl_2 y/o ZnCl_2 .

a) Adiciones de CdCl_2 A pH 7.5

La evolución de los polarogramas para diversas adiciones de cadmio están representadas en la figura 99. Contrariamente a lo que se podía preveer no se observa claramente el desplazamiento del zinc por el cadmio. Sin embargo, lo mas significativo que se

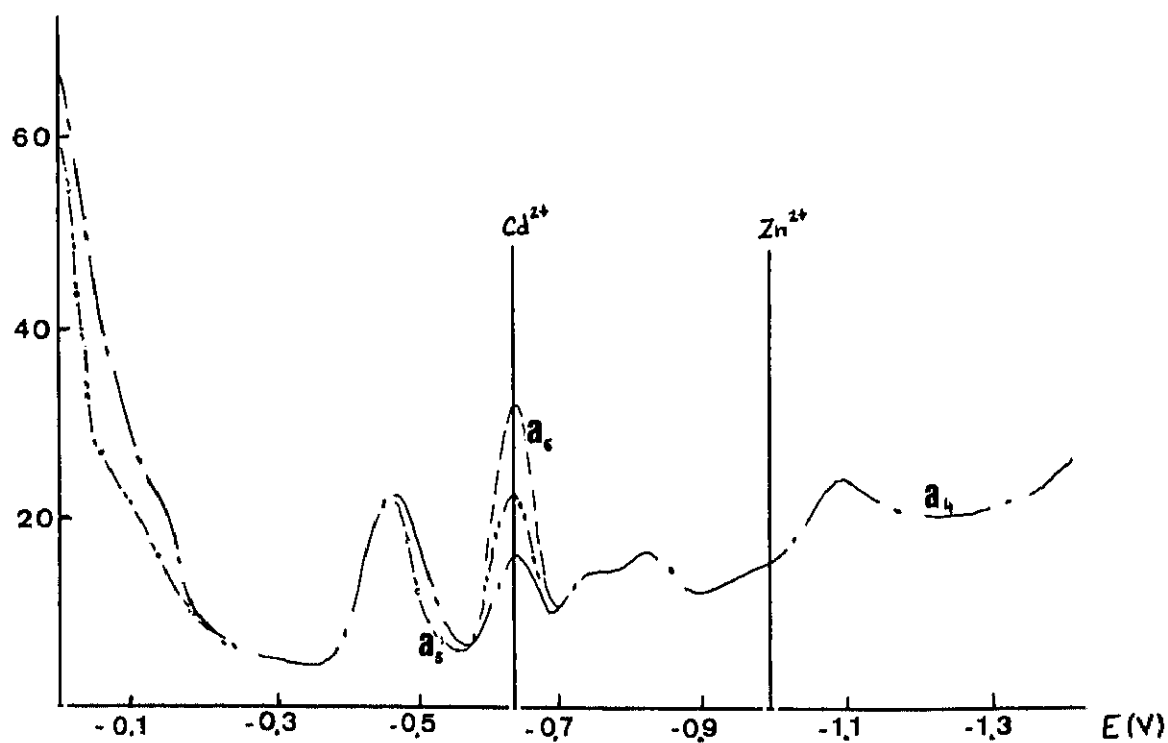
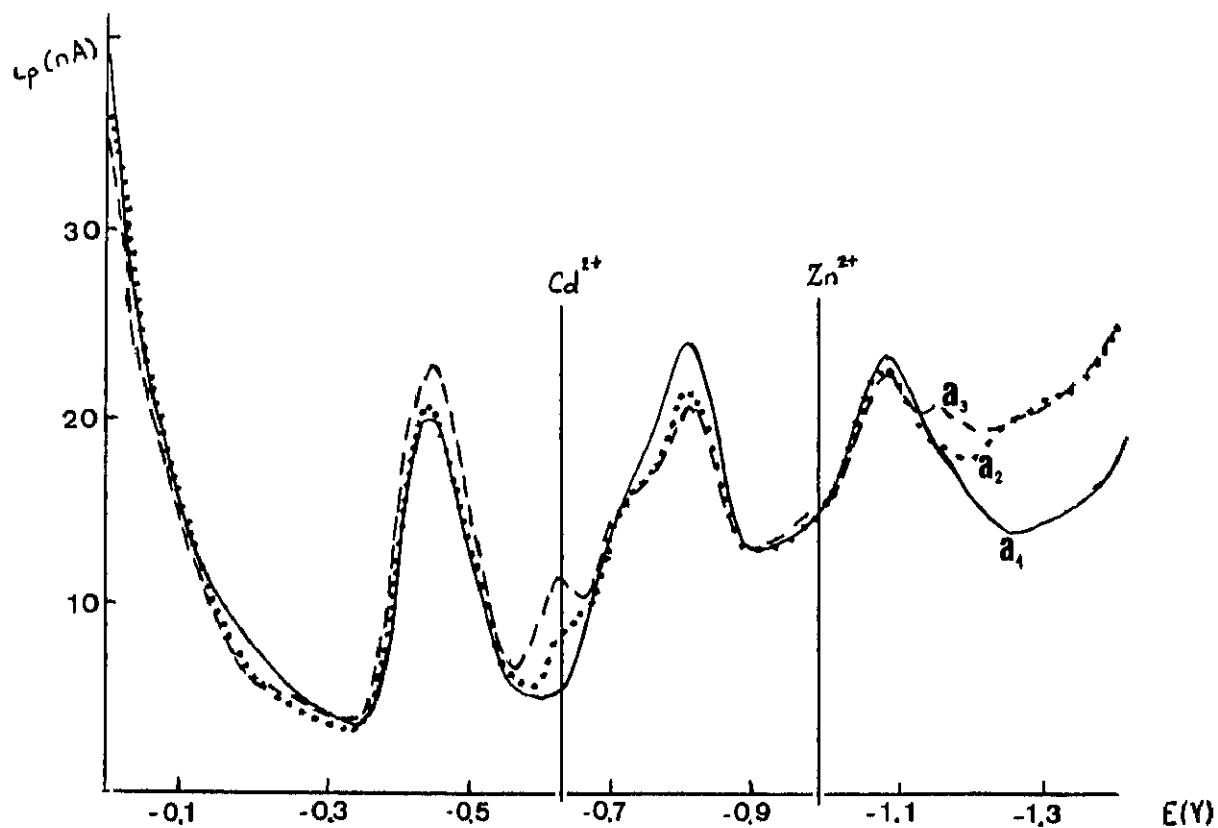


Fig. 99. Evolución de los polarogramas D.P.P. de una disolución de MT r.l. M7641 lot.20H9650, $7.69 \cdot 10^{-7}$ preparada en TRIS HCl $2.5 \cdot 10^{-2}$ M a pH 7.5 tras las sucesivas adiciones de CdCl_2 en concentraciones: a₁) $1.78 \cdot 10^{-7}$, a₂) $3.56 \cdot 10^{-7}$, a₃) $5.34 \cdot 10^{-7}$, a₄) $8.9 \cdot 10^{-7}$ y a₅) $1.33 \cdot 10^{-6}$ M

puede señalar es el desdoblamiento del pico polarográfico atribuido al complejo Cd-T.

A partir de los polarogramas se pueden hacer las siguientes observaciones:

a) El potencial en valores absolutos y la intensidad del primer pico aumenta ligeramente durante las primeras adiciones, como puede observarse en la figura 99a, en la que se representa la variación del potencial correspondiente al primer pico de la MT en función de la relación existente entre la concentración de cadmio añadido y la presente en la proteína.

b) El tercer pico atribuido a la Zn-T sufre, en primer lugar una disminución de la señal, tras la adición de CdCl_2 , figura 99a1; posteriores adiciones provocan que este pico esté cada vez menos definido, como si fuese debido a la superposición de varios picos no resueltos y más desplazado hacia potenciales más negativos (a_2, a_3). A partir de una concentración dada de cadmio añadido, aproximadamente igual a la concentración de cadmio presente en la MT empieza a deformarse el pico que corresponde al potencial atribuido al complejo de zinc posiblemente por la aparición de Zn^{2+} libre. Esta atribución de pico al zinc no es segura ya que, por una parte, el potencial de los picos correspondientes al zinc libre y complejado son próximos entre ellos y, a su vez, en la zona de potenciales cercanos al límite dado por el dominio de electroactividad del disolvente en reducción y, por otra, el aparato utilizado acomoda la escala al pico de mayor tamaño, en este caso el catión cadmio libre, por lo que los picos de menor intensidad no están bien definidos.

c) Sobre el pico atribuido al complejo Cd-T se observan varios fenómenos tras la adición de CdCl_2 en exceso. En primer lugar empieza a surgir un hombro que posteriormente se define perfectamente como un pico a aproximadamente -0.75 V (versus Ag/AgCl) (fig. 99 a4), potencial diferente al atribuido al catión cadmio libre. De acuerdo con el valor del potencial, este nuevo

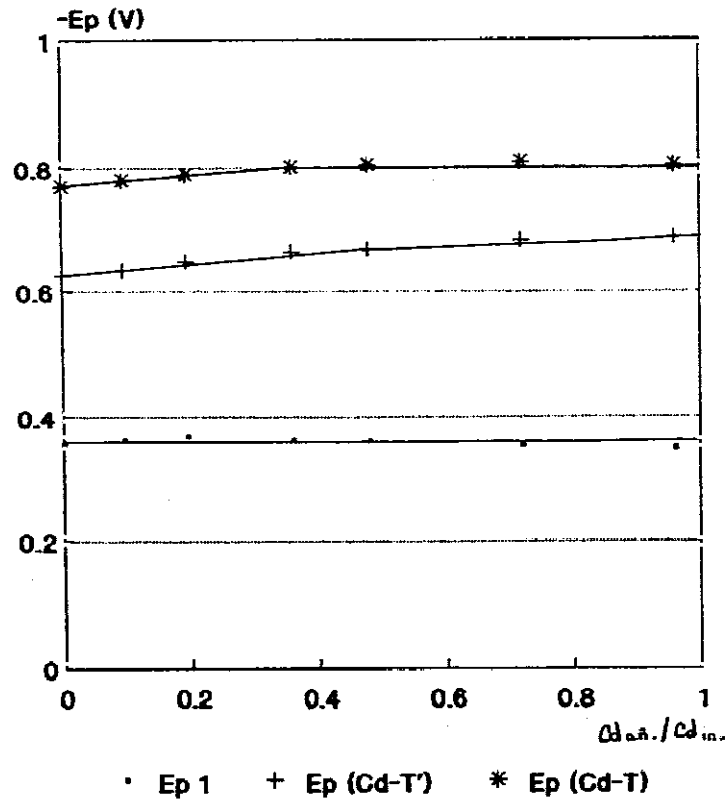
pico que aparece podía ser debido a otro complejo, distinto del observado inicialmente, al que hemos denominado Cd-T'. Este complejo Cd-T' es más débil que el inicial Cd-T ya que la diferencia de potencial al que aparece y el del cadmio libre es menor que la diferencia $E_{p_1}(MT) - E_{p_{Cd^{2+}}}$ atribuido al complejo inicial.

A partir de una concentración de $CdCl_2$ añadido, superior 1.5 veces a la de metalotioneína existente, aparece el pico del cadmio(II) libre cuya intensidad aumenta linealmente como se observa en las figuras 99 a3-a6.

Nuestros resultados no se pueden contrastar con otros análogos en la literatura, porque no los conocemos. El que conocemos que estudia la influencia de la adición de cationes metálicos a una disolución de MT realizados en voltametría cíclica (340) no indican en ningún momento la aparición de un segundo complejo a potenciales menos negativos, sino simplemente un desplazamiento de unos cationes por otros.

Cuando se analiza la intensidad de señal para cada uno de los picos se pueden observar los resultados indicados en la figura 100. Estos valores de intensidad son difíciles de medir ya que los picos no están perfectamente definidos. Por lo tanto, los datos numéricos dados son indicativos de una evolución del sistema. De ellos se pueden destacar como hechos más significativos que la señal del primer pico aumenta ligeramente en las primeras adiciones. La señal debida al complejo Cd-T' va aumentando a medida que lo hace la cantidad de cadmio presente en la disolución y que parece que llega a alcanzar una meseta que indicaría la saturación del sistema. Sin embargo, la señal debida al exceso de catión cadmio libre que aparece a una concentración de cadmio, 1.5 veces superior a la de la metalotioneína, aumenta de forma lineal en relación a la adición de la sal de dicho catión. Mientras que la atribuida al complejo Cd-T' disminuye en las primeras adiciones, para después mantenerse constante.

Variación de E_p (V)
en función del cadmio añadido



Variación i_p
en función del cadmio añadido

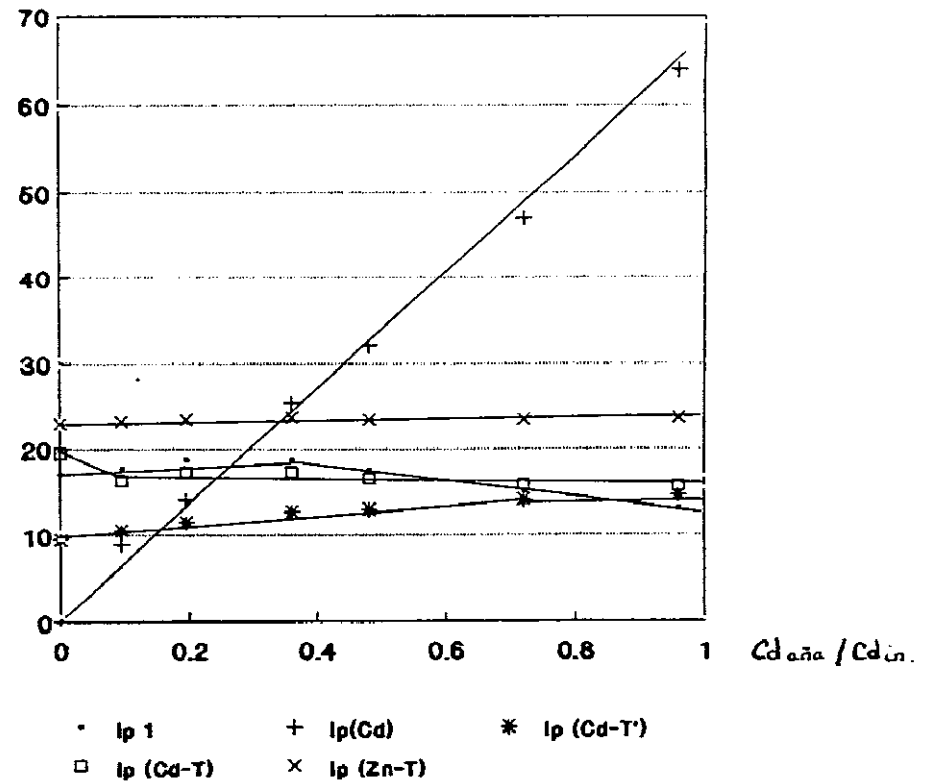


Fig. 100. Variación del potencial y la intensidad de cada uno de los picos en función de la relación de concentraciones $Cd_{añadido} / Cd_{inicial}$

b) Adiciones de ZnCl_2 a diferentes pH: 6.0, 7.5, 8.5 y 10.0

Se ha realizado un estudio análogo al precedente en el caso de las adiciones patrón de Cd(II) . En este caso se ha llevado a cabo a diferentes pH. La evolución de los polarogramas en función de la cantidad añadida se representan en las figuras 101-103. Así mismo, se ha representado el potencial y la intensidad para cada uno de los picos, a diferentes pH, en función del mismo parámetro (fig. 104-109).

En primer lugar, cabe señalar que el fenómeno descrito en el caso de las adiciones de cadmio respecto al desdoblamiento del segundo pico, Cd-T , en dos, correspondientes a los complejos Cd-T y Cd-T' es mucho más marcado en este caso. En efecto, se observa que, a todos los pH estudiados, en la primera adición de zinc, el pico correspondiente a la Cd-T desaparece casi completamente para dar lugar al complejo Cd-T' (fig.101-4, 102-a3, 102-b4, 103-a3 y 103-b4). La intensidad de este nuevo pico, Cd-T' , aumenta linealmente en función de la cantidad añadida de zinc(II) hasta que la relación entre el zinc añadido y el inicial existente en la MT está comprendida entre 2 y 2.5, lo que corresponde, con respecto al cadmio contenido inicialmente en la muestra, a una concentración de zinc igual a la mitad de la inicial, $C_{\text{Zn}} = C_{\text{Cd}}/2$. Este fenómeno ocurre a todos los pHs estudiados (fig.107).

Esto parece indicar que la adición de zinc favorece la formación del complejo Cd-T' , o, lo que es lo mismo, la destrucción del complejo más estable termodinámicamente, Cd-T .

Por otra parte, los potenciales de los picos iniciales varían ligeramente, de forma casi inapreciable, desplazandose hacia potenciales menos negativos en la mayor parte de los casos (fig.104).

Con respecto al primer pico (fig. 105), su intensidad aumenta ligeramente en función del zinc añadido. Si la respuesta polarográfica es debida a la oxidación del mercurio en presencia

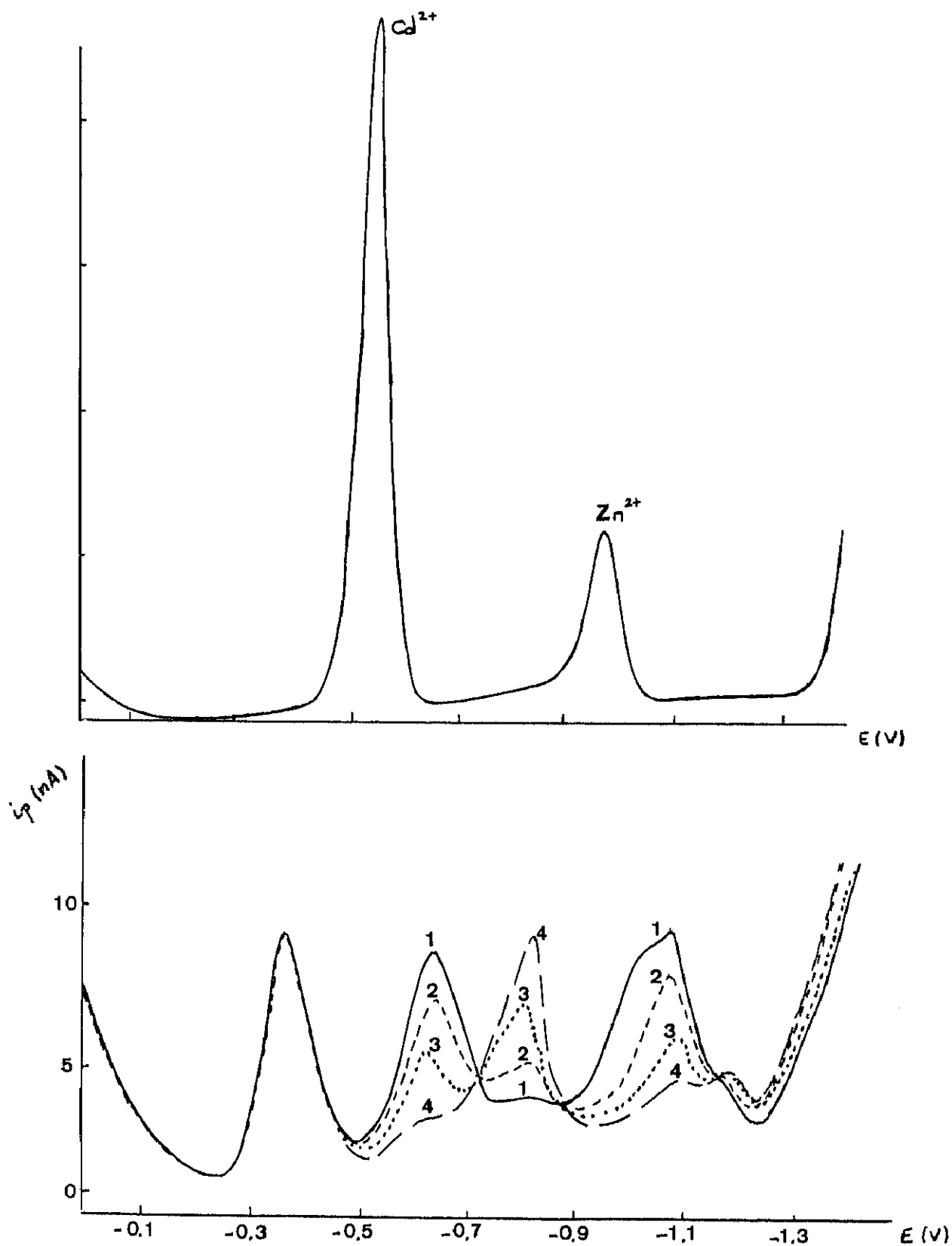


Fig. 101. Evolución de los polarogramas D.P.P. de una disolución de MT r.l. M7641 lot.20H9650, $7.69 \cdot 10^{-7}$ preparada en TRIS HCl $2.5 \cdot 10^{-2}$ M a pH 8.5 tras las sucesivas adiciones de ZnCl_2 en concentraciones: 1)

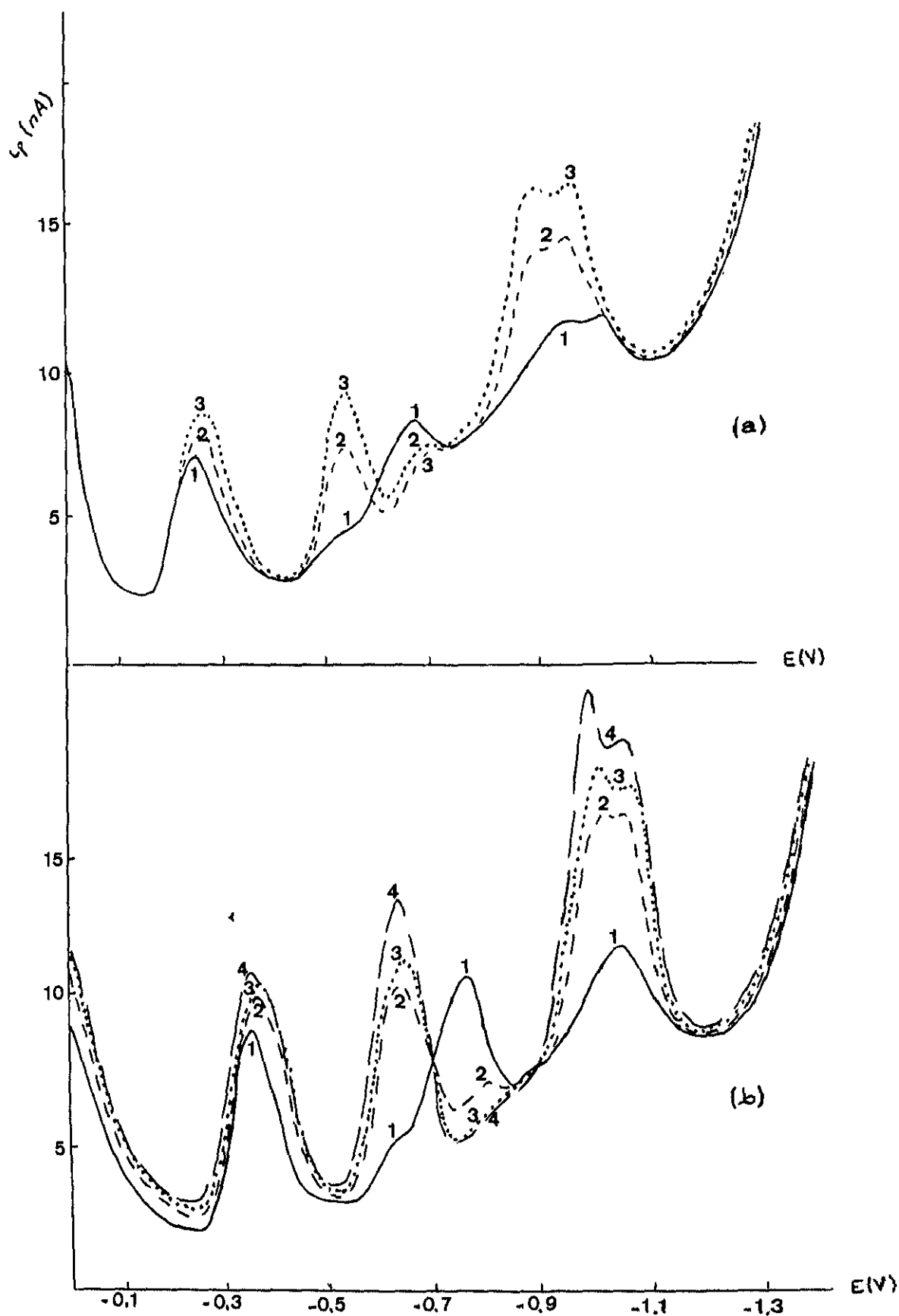


Fig. 102. Evolución de los polarogramas D.P.P. de una disolución de MT r.l. M7641 lot.20H9650, $7.69 \cdot 10^{-7}$ preparada en TRIS HCl $2.5 \cdot 10^{-2}$ M a dos pHs diferentes (a) pH 6.0 y (b) pH 7.5, tras las sucesivas adiciones de ZnCl_2 en concentraciones: 1) sin añadir zinc, 2) $2.85 \cdot 10^{-7}$, 3) $5.69 \cdot 10^{-7}$, 4) $8.53 \cdot 10^{-7}$.

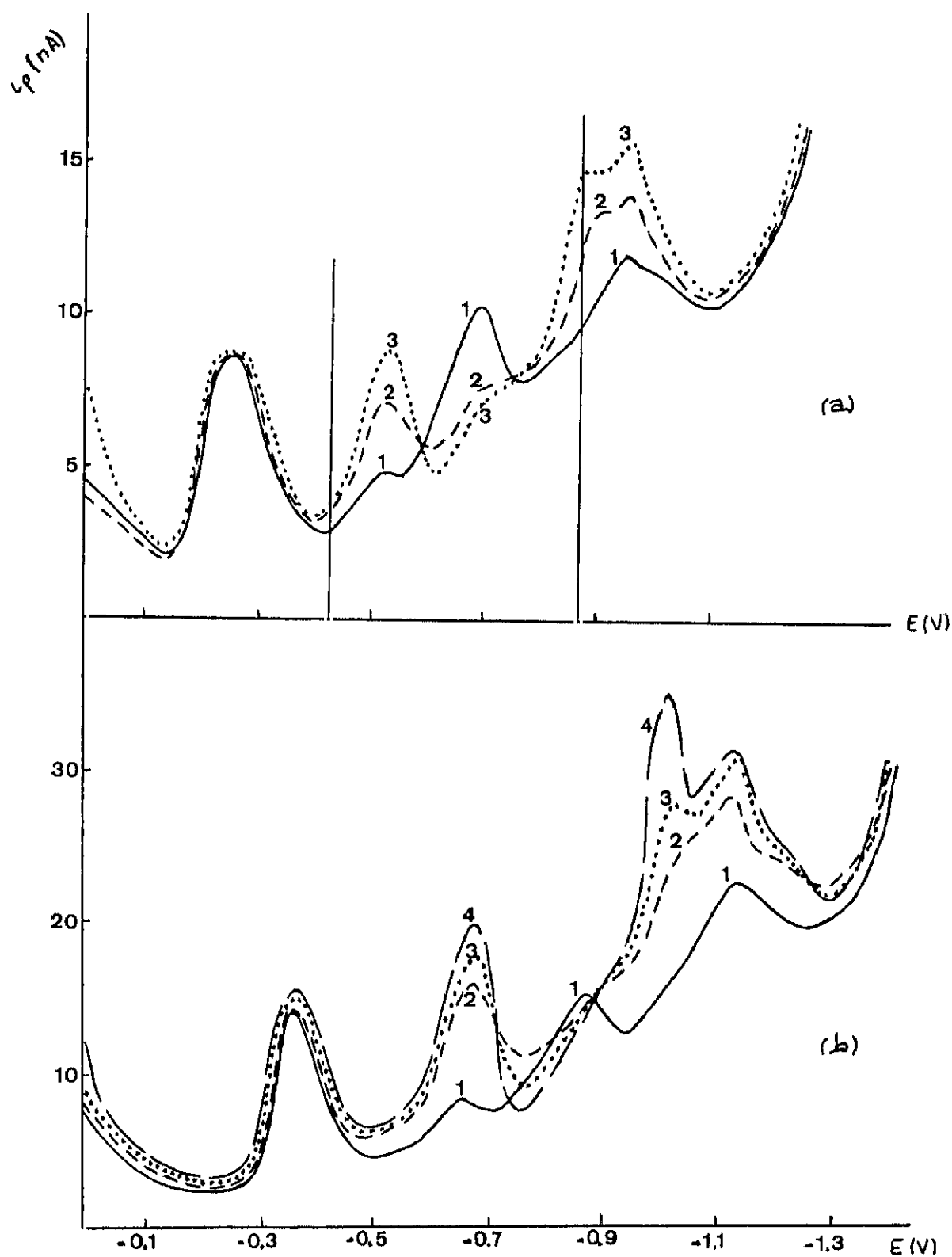


Fig. 103. Evolución de los polarogramas D.P.P. de una disolución de MT r.l. M7641 lot.20H9650, 7.69×10^{-7} preparada en TRIS HCl 2.5×10^{-2} M a dos pHs diferentes (a) pH 8.5 y (b) pH 10, tras las sucesivas adiciones de $ZnCl_2$ en concentraciones: 1) sin añadir zinc, 2) 2.85×10^{-7} , 3) 5.69×10^{-7} , 4) 8.53×10^{-7} .

Variación $E_p(V)$ en función de la adición de zinc

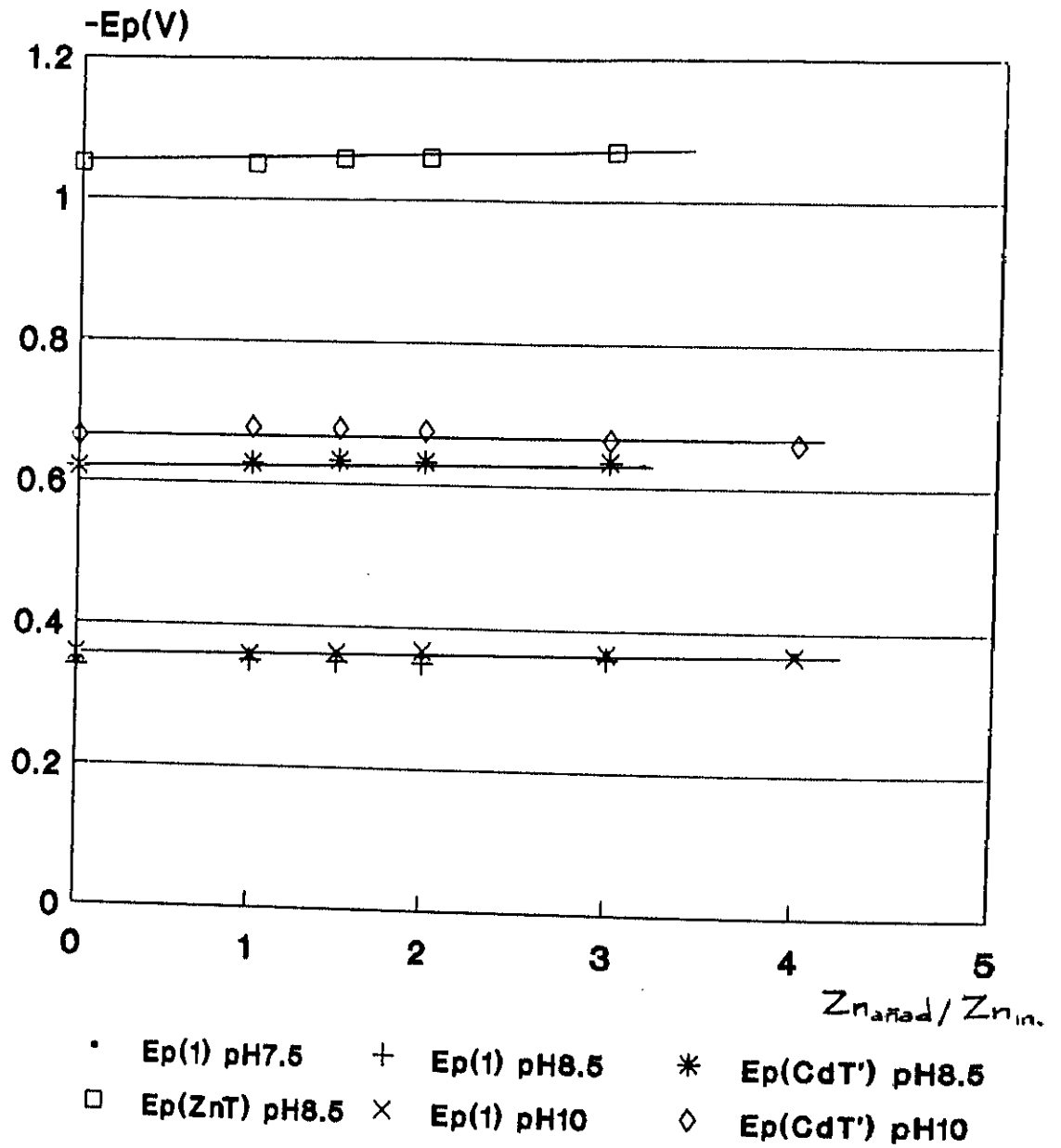


Fig. 104. Variación del potencial de cada uno de los picos a cada uno de los pH estudiados: 7.5, 6.0, 8.5 y 10.

Variación $i_p(1)$ en función de la adición de zinc

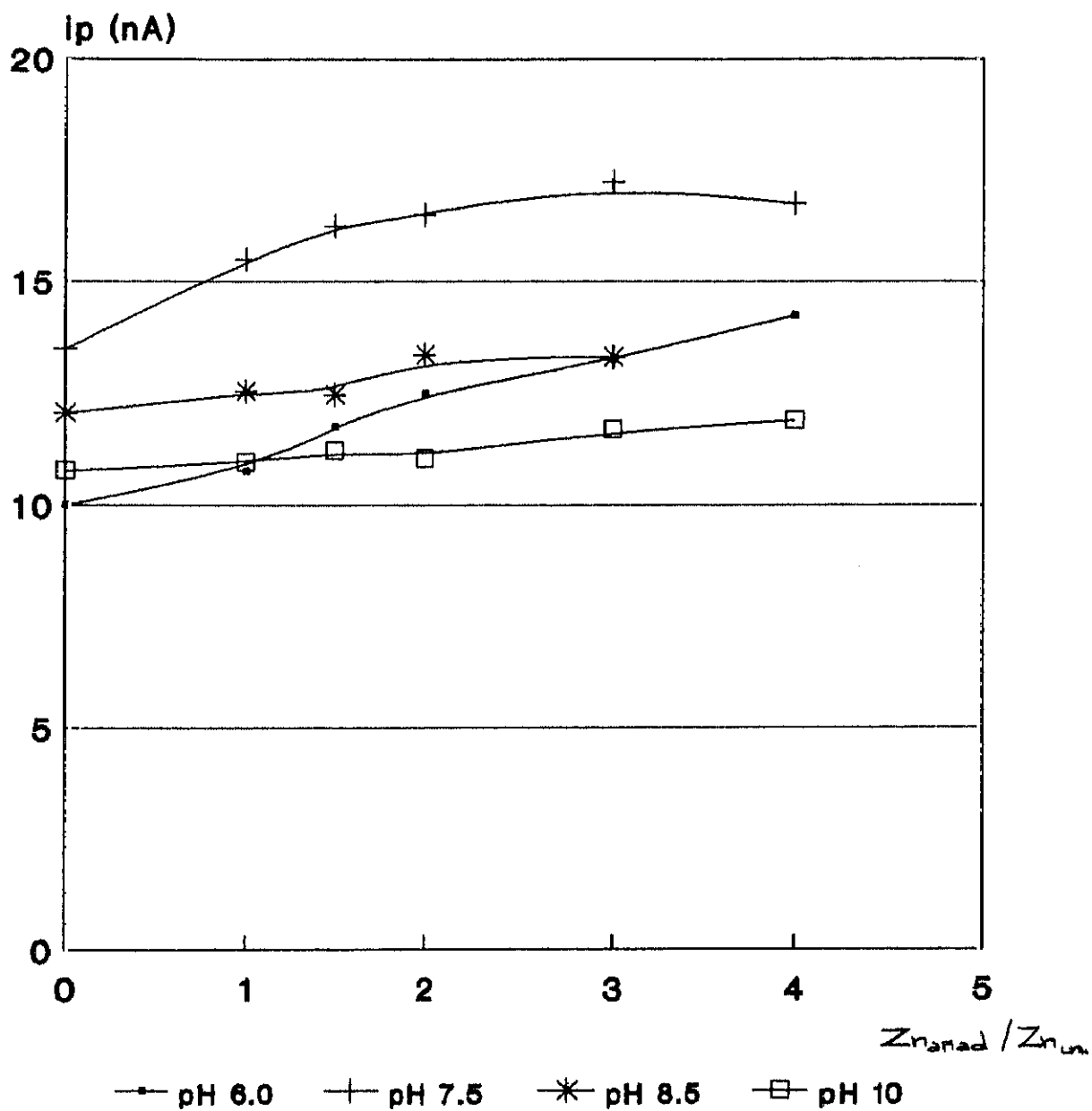


Fig. 105. Variación de la intensidad de señal del primer pico a cada uno de los pHs estudiados: 6.0, 7.5, 8.5 y 10.

Variación $i_p(\text{Cd-T})$ en función de la adición de zinc

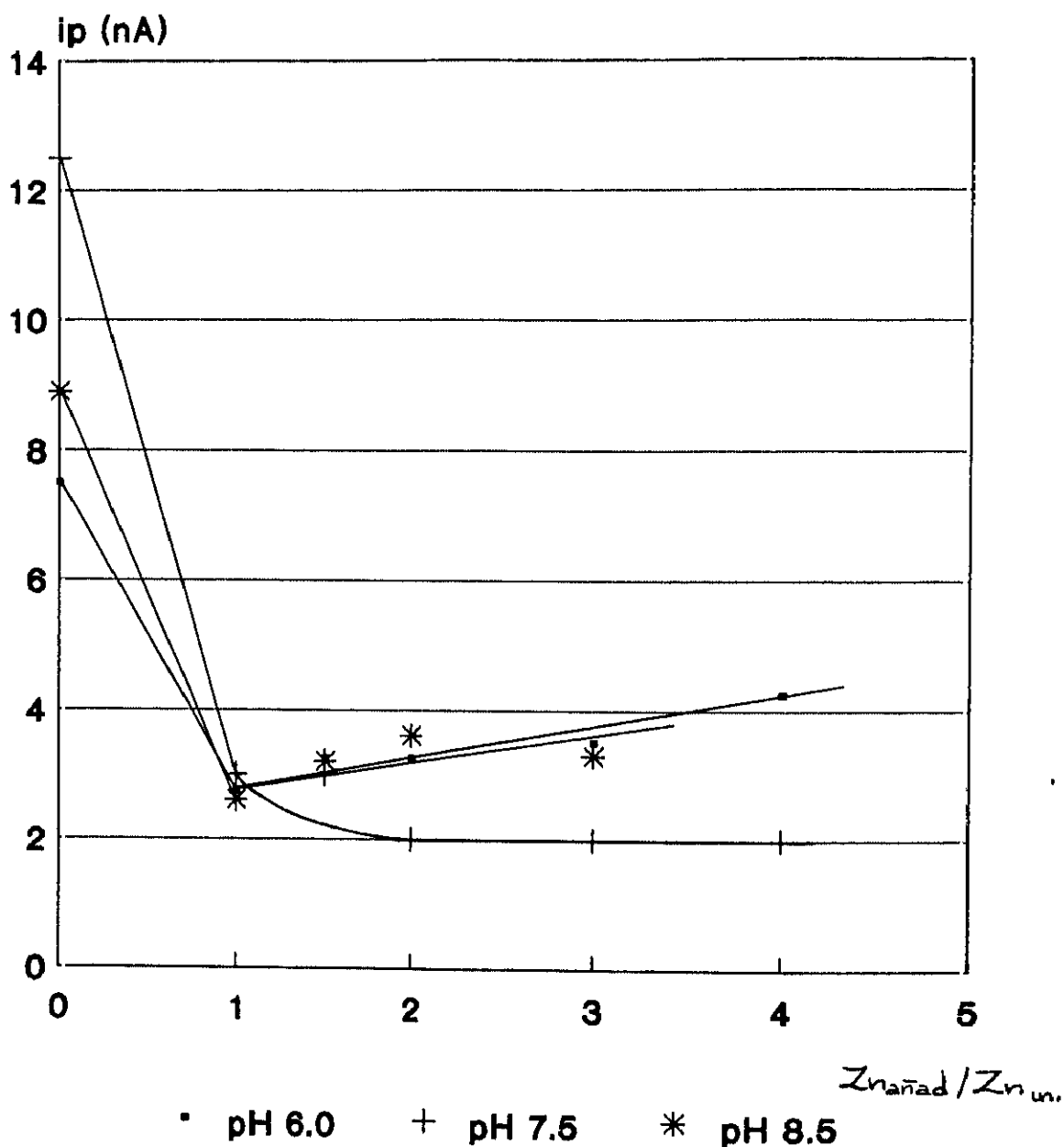


Fig. 106. Variación de la intensidad de señal del pico correspondiente al complejo Cd-T en función de la cantidad de zinc añadido, a cada uno de los pHs estudiados: 6.0, 7.5, 8.5 y 10.

Variación $i_p(\text{Cd-T}')$ en función de la adición de zinc

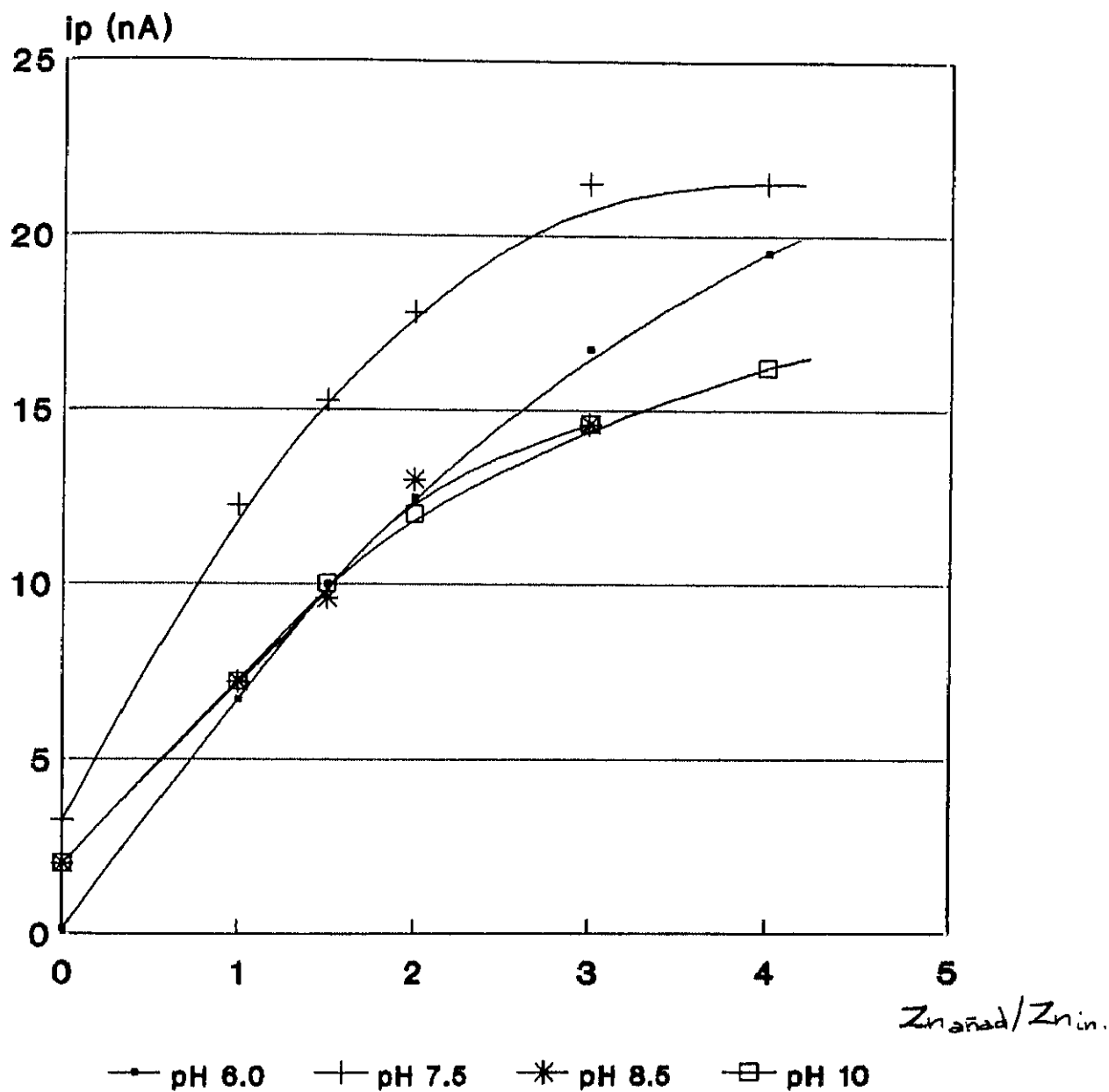


Fig. 107. Variación de la intensidad de señal del pico correspondiente al complejo $\text{Cd-T}'$ en función de la cantidad de zinc añadido, a cada uno de los pHs estudiados: 6.0, 7.5, 8.5 y 10.

Variación $i_p(\text{Zn})$ en función de la adición de zinc

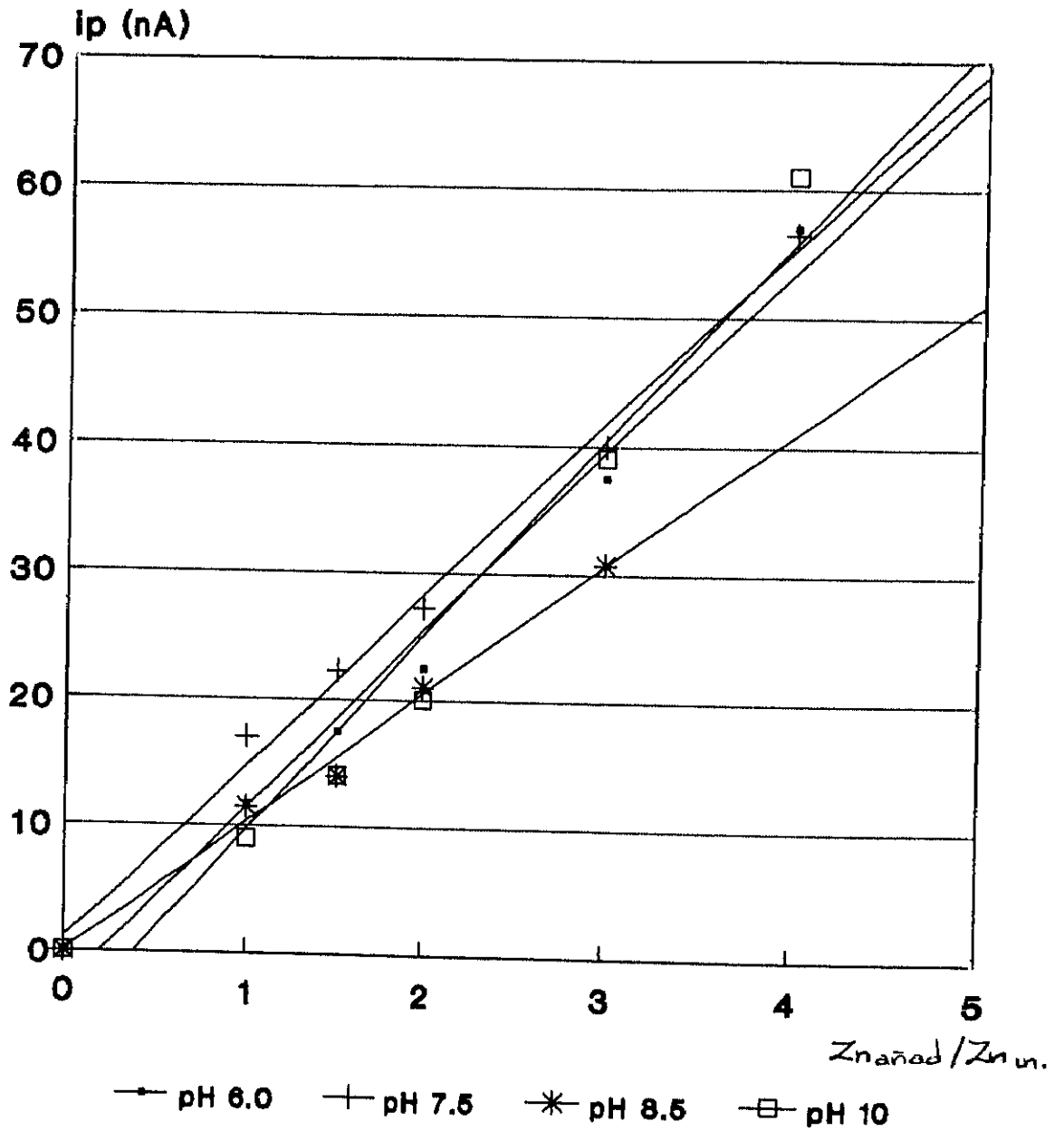


Fig. 108. Variación de la intensidad de señal del pico correspondiente al Zn^{2+} en función de la cantidad de zinc añadido, a cada uno de los pHs estudiados: 6.0, 7.5, 8.5 y 10.

Variación $i_p(\text{Zn-T})$ en función de la adición de zinc

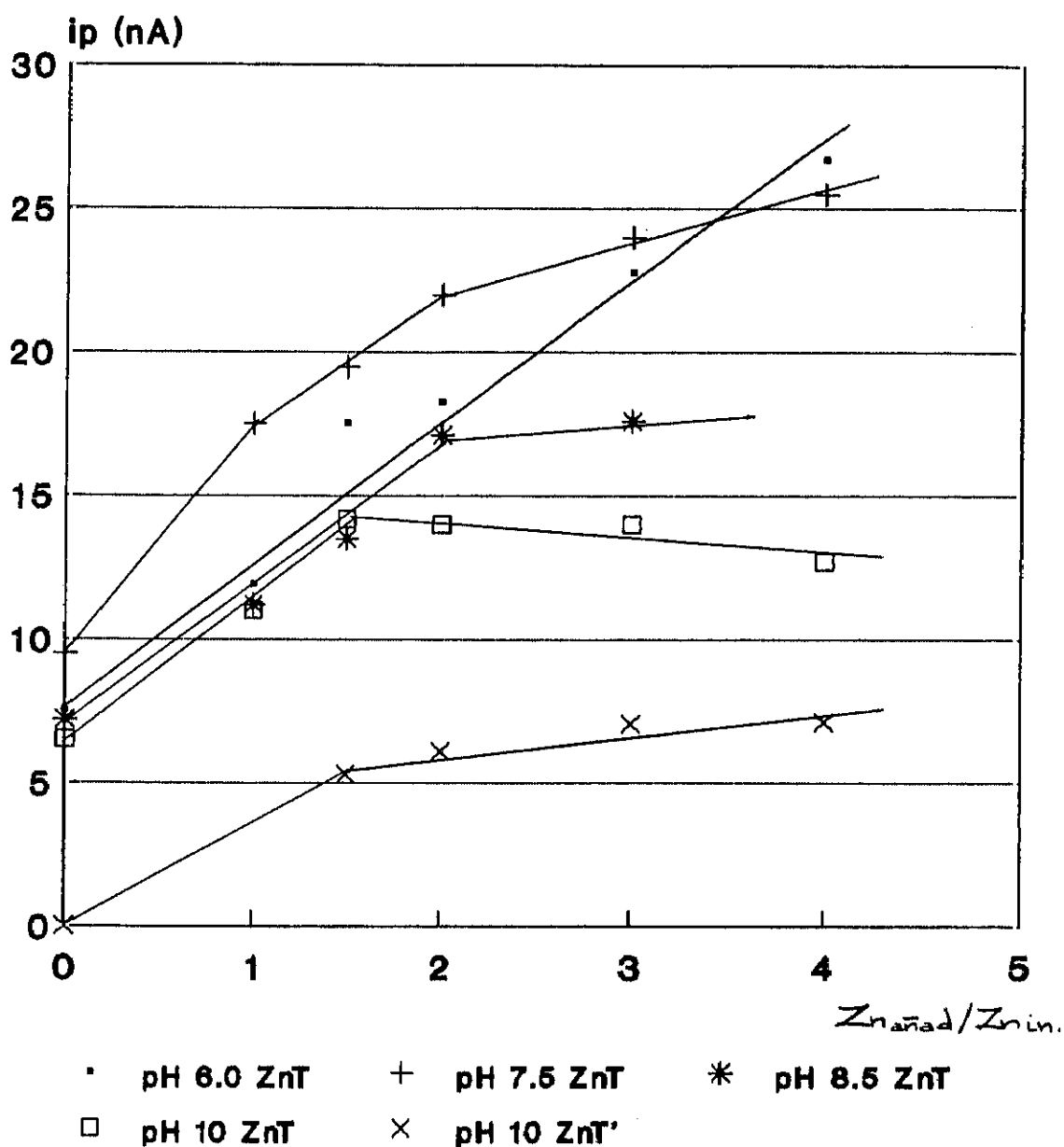


Fig. 109. Variación de la intensidad de señal del pico correspondiente al complejo Zn-T en función de la cantidad de zinc añadido, a cada uno de los pHs estudiados: 6.0, 7.5, 8.5 y 10.

de los grupos tiólicos, debería ser función únicamente de la concentración de la apotioneína, independiente de la adición de cationes, por lo que el aumento de la señal se puede explicar difícilmente. Seguramente debe haber fenómenos diversos que se superponen y cuya naturaleza es desconocida para nosotros. Este fenómeno es más marcado cuanto menor es el pH (fig. 102 a,b y 103 a,b).

Se observa, así mismo, un desdoblamiento del tercer pico, el atribuido al complejo Zn-T. Los dos picos que aparecen no corresponden, en todos los casos, al potencial debido al zinc libre, pero es difícil sacar conclusiones con respecto a los fenómenos que ocurren en este intervalo de potencial, como ya se ha indicado anteriormente, debido a la proximidad al dominio de electroactividad del disolvente (fig. 102, 103). Cuanto más básico es el pH más clara parece la presencia de zinc libre en disolución, ya que el desdoblamiento del pico se aproxima más hacia el potencial de este catión.

c) Cálculo de las constantes aparentes de formación de los complejos Cd-T Y Cd-T'

A partir de la diferencia de potencial de los picos atribuidos a los complejos Cd-T y Cd-T' con respecto al potencial del catión libre se puede evaluar las constantes de complejación aparente para ambos complejos, tal y como se ha realizado precedentemente.

Los valores obtenidos para los pK' de los complejos de cadmio se presentan en la tabla siguiente:

Tabla 25. Valores de las constantes aparentes de estabilidad para los complejos Cd-T y Cd-T' en función del pH de la disolución del TRIS·HCl

pH	Cd-T		Cd-T'	
	$E(E_{CdT} - E_{Cd})$ en V	pK' Cd-T	$E(E_{CdT'} - E_{Cd})$ en V	pK' Cd-T'
6.0	0.21-0.25	7.24-8.62	0.096-0.10	3.31-3.45
7.5	0.226	7.79	0.10-0.106	3.45-3.66
8.5	0.274	9.45	0.11-0.118	3.86-4.07
10.0	0.340	11.72	0.118-0.14	4.07-4.83

* E_{pCd} utilizado a cada pH es el valor experimental obtenido en cada caso.

La variación de los pK' en función del pH está representada en la figura 110.

Existe una variación lineal del pK' en función del pH en el intervalo de pH estudiados. La pendiente de la recta nos da una indicación del número de protones implicado en el proceso de complejación y que es de 1.5 para el de Cd-T y de 0.5 para el Cd-T', por lo tanto, se puede decir que es probable que el cadmio se encuentre unido de diferente manera en ambos complejos.

Aunque el número de puntos utilizados en el cálculo de la pendiente es muy pequeño, sí se puede indicar que la relación de pendientes entre uno y otro complejo es aproximadamente 3, lo que implica, en primer lugar, que la naturaleza de los complejo es diferente y también diferente a la del Zn-T y, en segundo, que el número de protones que intervienen no es el mismo, lo que implica que los enlaces S-M no sean del mismo tipo, sino también diferentes.

$pK(Cd-T)$ y $pK(Cd-T')$ en función del pH

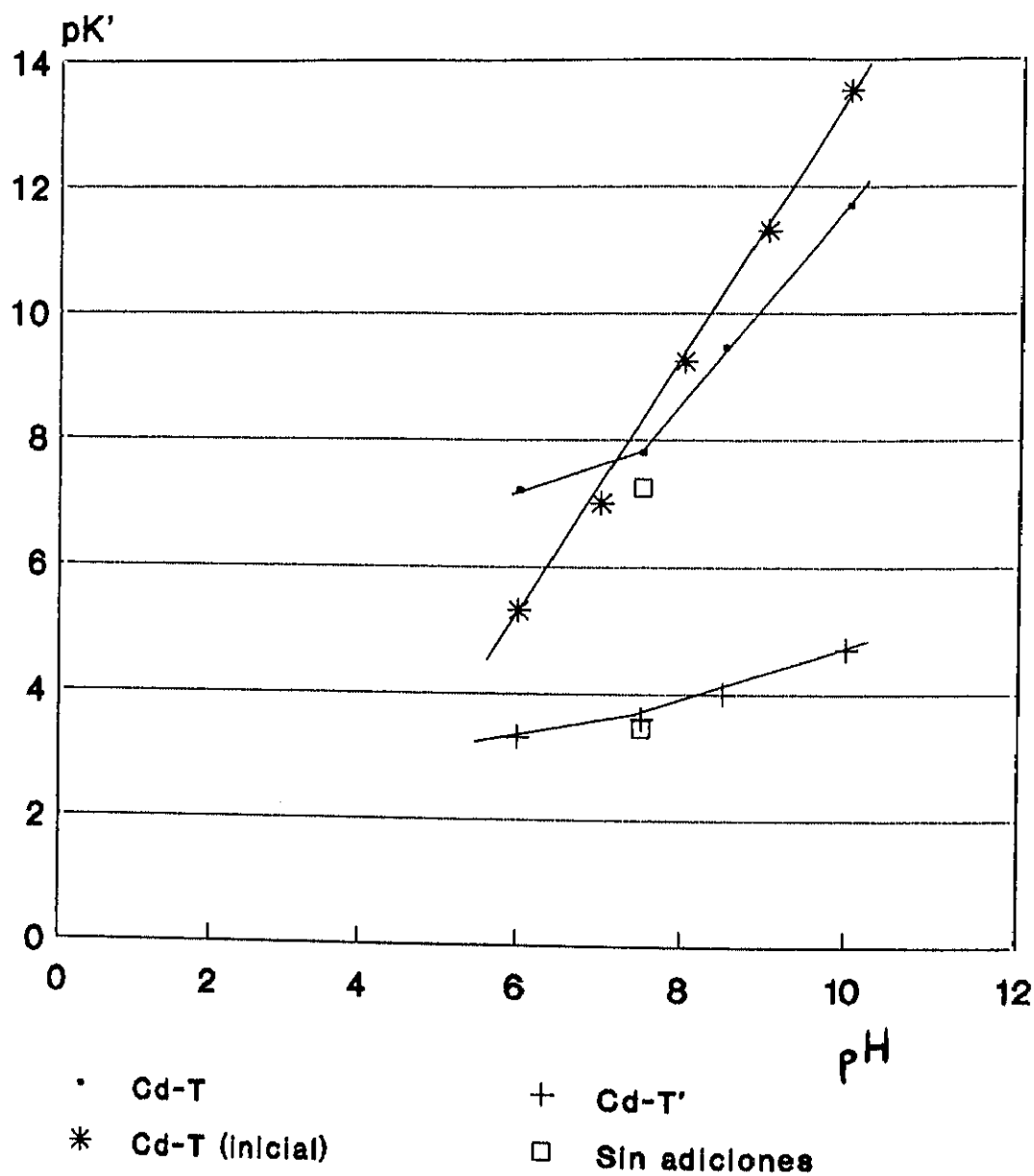


Fig. 110. Variación de $pK(Cd-T)$ y $pK(Cd-T')$ a los cuatro diferentes pH, 6.0, 7.5, 8.5 y 10, sin y con las adiciones de sales de zinc.

Si se compara, así mismo, con la pendiente obtenida para $pK'_{CdT}=f(pH)$, en ausencia de adiciones patrón, cuyo valor es 2 lo que implica que en el proceso de complejación intervienen dos protones, la naturaleza de los complejos también debe ser diferente en este caso. Es posible que la adición de cationes metálicos modifique la molécula de MT de tal manera que existan funciones suplementarias para formar enlaces y que éstas presentan diferentes características. En una discusión general, al final de este capítulo, sobre la estructura de la MT se expone una propuesta para este fenómeno.

Por otra parte la suma de las pendientes $pK=f(pH)$ de los dos complejos Cd-T y Cd-T' es igual a 2 y, por lo tanto, igual a la pendiente $pK=f(pH)$ del complejo inicial.

La aparición del segundo complejo, Cd-T', menos fuerte que el inicial de Cd-T que aparece tras sucesivas adiciones de cationes metálicos a la disolución y cuya fuerza de unión cadmio-tiól es menor, podría deberse a una modificación que sufra la estructura compleja de la metalotioneína. Como ya se ha indicado en el segundo capítulo de esta memoria, cada catión metálico se encuentra unido a tres grupos tiólicos, dos procedentes de dos residuos de cisteína próximos y el tercero más distanciado en la secuencia aminoacídica. El exceso de cationes metálicos podría provocar un ligero ensanchamiento de los "clusters" en que se encuentran los cationes incluidos y, por lo tanto, produciría que la interacción entre los cationes existentes inicialmente en la molécula y el tercer grupo tiólico fuese disminuyendo hasta desaparecer. Una vez rota esta interacción quedarían restos tiólicos libres que serían capaces de interaccionar con los cationes metálicos que existían en exceso en la disolución. Por lo tanto, el número de cationes asociados a la tioneína sería mayor, pero la unión sería menos fuerte, hecho que parece confirmarse con los ensayos realizados en polarografía de impulsos diferencial.

V.C.1.D. ESTABILIDAD DE LA MT

Como se ha mostrado en el apartado anterior, parece probable la existencia de dos complejos, Cd-T y Cd-T' , del cadmio. El primero más estable termodinámicamente se descompone, en presencia de zinc, para dar lugar a Cd-T' menos estable. Esto se puede explicar si se hace la hipótesis de que el complejo Cd-T es lábil y que se descompone con el tiempo. Con el fin de analizar la estabilidad de la MT y, al mismo tiempo obtener información sobre la hipótesis expuesta se ha realizado un estudio de la evolución de las disoluciones de MT en función del tiempo. Para ello se han empleado dos técnicas, la polarografía diferencial de impulsos, D.P.P. y la redisolución anódica, D.P.S. Se ha considerado que los fenómenos de adsorción en el mercurio podían desempeñar un papel importante y, por lo tanto, en la primera de las técnicas se han realizado las experiencias en presencia de una capa de mercurio en contacto con la disolución en la célula, con agitación y sin agitación, para comprobar el efecto del mayor contacto entre la capa de mercurio y la disolución.

Hay que indicar que, en todos los casos, en el intervalo de tiempo en que se han efectuado los polarogramas la muestra se mantuvo en nevera y, que tras la lectura a tiempo cero, siempre existe mercurio en la disolución, por lo que el contacto con este metal es constante.

a) Polarografía de impulsos diferencial

Se ha realizado la lectura polarográfica de una disolución MT r.l. a pH 7.5 en función del tiempo. Varios ejemplos de polarogramas se muestran en la figura 111.

Si se comparan los potenciales a los que aparecen los picos con los obtenidos en las experiencias presentadas en el apartado precedente, se observa que el pico atribuido al complejo Cd-T

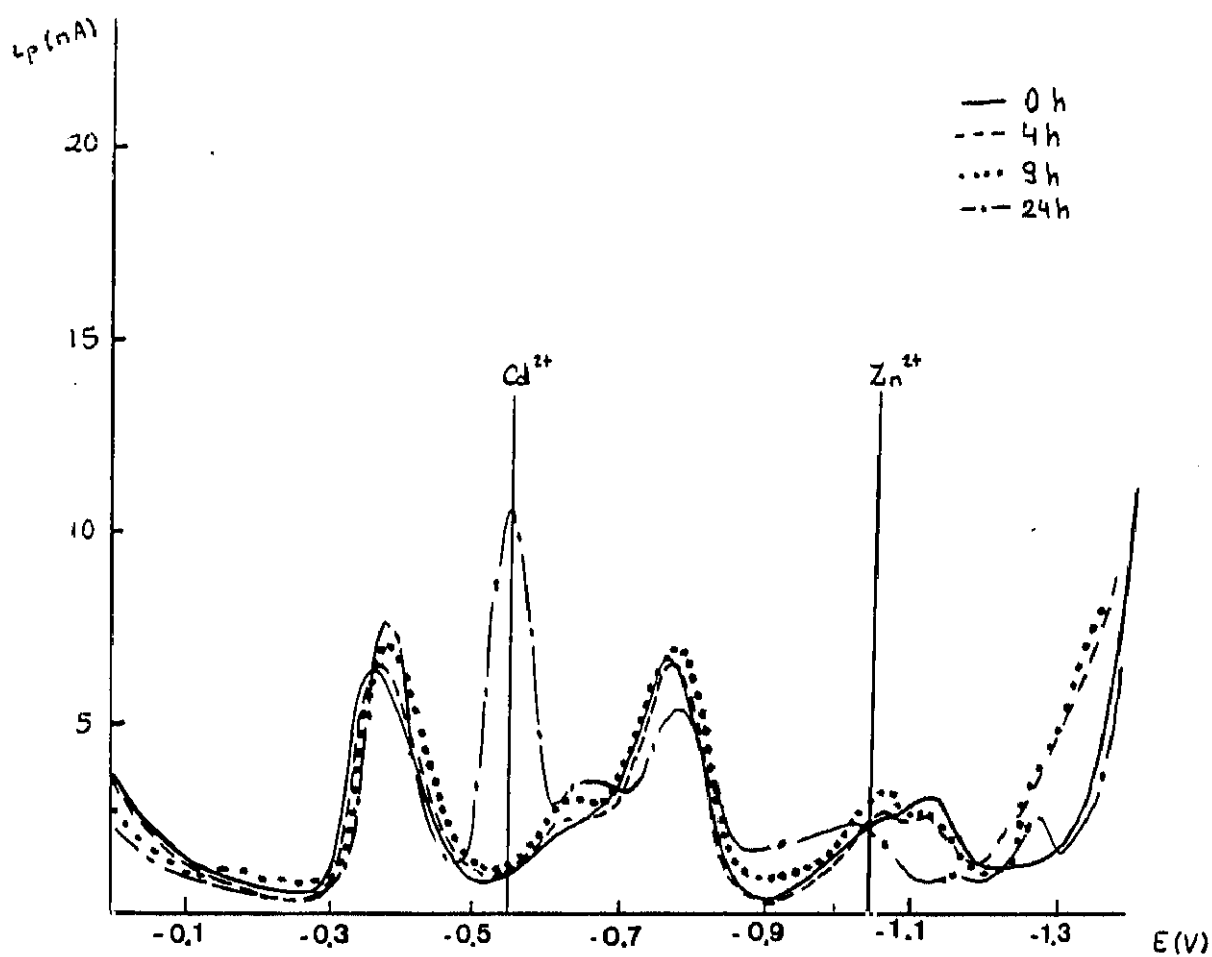


Fig. 111. Evolución de los polarogramas en D.P.P. de una disolución $7.69 \cdot 10^{-4}$ M de metalotioneína, preparada en tampón TRIS HCl $2.5 \cdot 10^{-4}$ M de pH 7.5, en función del tiempo.

comienza a desdoblarse de manera similar a como ocurría cuando se adicionaba a la disolución ZnCl_2 . Es decir, aparece el pico que se ha atribuido a un segundo complejo mas débil del cadmio con la tioneína y que se ha propuesto como Cd-T' . Este pico, Cd-T' , aumenta según transcurre el tiempo a la vez que el primero, encontrado para $t=0$ y que se ha denominado Cd-T , disminuye (fig.111). Veinticuatro horas después de preparada la disolución puede observarse un nuevo pico que aparece en el potencial correspondiente al cadmio libre (fig. 111d).

En el caso de los picos atribuidos, bien al zinc libre o al zinc complejoado, el hecho de que los potenciales de los diferentes picos son similares es más difícil observar cualquier tipo de cambio que se pueda producir. Si existe un desplazamiento hacia potenciales menos negativos es probable que el pico polarográfico corresponda a la reducción de más de un compuesto electroquímico pero que la resolución de esta técnica no sea lo suficientemente importante para poder diferenciar los picos.

En la tabla 26 se resume lo que se ha dicho y en ella se indican los potenciales de los picos, así como las intensidades correspondientes a los tiempos en que se han realizado las medidas.

En la discusión general, se expone una hipótesis para explicar el comportamiento de desdoblamiento del pico atribuido al complejo del cadmio de la MT, que como hemos visto en el apartado anterior también se produce cuando existe exceso de cationes libres en disolución.

Tabla 26. Potenciales e intensidad de pico de una disolución $7.69 \cdot 10^{-7}$ de MT r.l. en TRIS·HCl $2.5 \cdot 10^{-2}$ en función del tiempo transcurrido desde su preparación (*).

P I C O	0 HORAS	4 HORAS	9 HORAS	24 HORAS
1º PICO	5.56	5.93	6.11	6.48
Cd ²⁺	----	----	----	8.15
Cd-T'	0.56	0.56	0.65	0.65
Cd-T	5.37	5.00	5.18	2.96
Zn ²⁺	----	----	----	1.30
Zn-T	1.85	1.76	1.85	----

Se ha realizado un segundo ensayo análogo con dos MT de distinto origen, "horse kidney" y "rabbit liver", con medidas realizadas a intervalos de tiempo menores.

Los polarogramas se muestran en la figura 112.

Se observan fenómenos análogos, independientemente del origen de las metalotioneínas. El complejo Cd-T se desdobla en los dos picos atribuidos a los complejos Cd-T y Cd-T', aunque de forma más paulatina (fig. 112).

Otro tercer estudio es el de la evolución del perfil polarográfico de la MT en función del tiempo, pero con fuerte agitación en los intervalos entre lecturas, esto provoca que el mercurio en el seno de la cubeta no esté formando una masa compacta, sino pequeñas gotículas que incrementan mucho la superficie. La evolución de los polarogramas se muestra en la figura 113.

Se observa que el proceso de degradación de la MT es mucho más rápido, puesto que aparecen los cationes libres en un intervalo de tiempo mucho más corto.

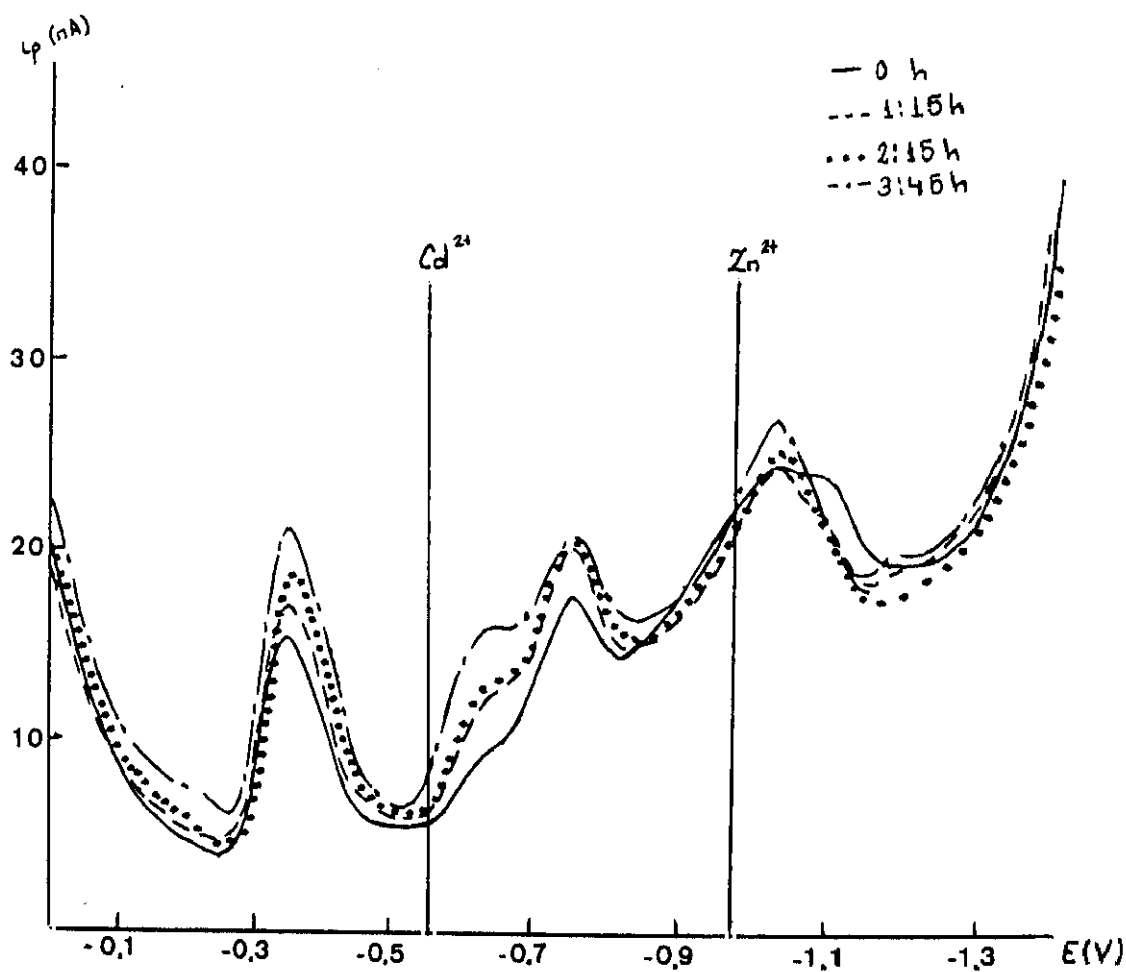


Fig. 112. Evolución de los polarogramas en D.P.P. de una disolución $7.69 \cdot 10^{-7}$ M de metalotioneína, preparada en tampón TRIS HCl $2.5 \cdot 10^{-3}$ M de pH 7.5, en función del tiempo (intervalos cortos).

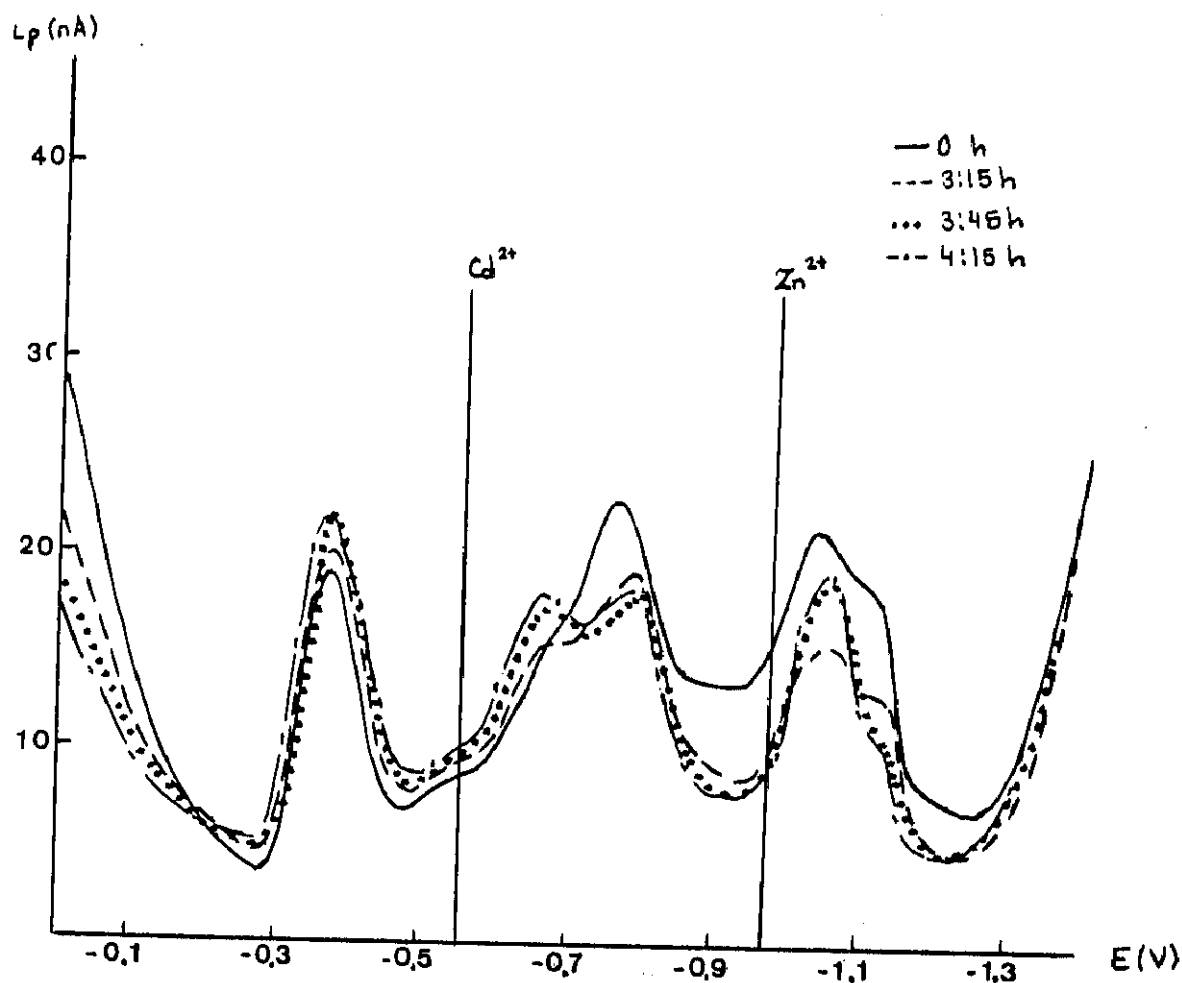


Fig. 113. Evolución de los polarogramas en D.P.P. de una disolución $1.54 \cdot 10^{-6}$ M de una metalotioneína "horse kidney", preparada en tampón TRIS HCl $2.5 \cdot 10^{-4}$ M de pH 7.5, en función del tiempo.

Si se realiza el proceso en las mismas condiciones que en el precedente ensayo, a $\text{pH}=10$ se observa un comportamiento totalmente análogo como se comprueba en los polarogramas de la figura 114; en él se destaca el desdoblamiento del pico debido al complejo Cd-T en dos atribuidos a Cd-T y Cd-T' y posteriormente dando lugar a la aparición del cadmio libre. La liberación de los cationes ligados a la proteína se produce en un intervalo de tiempo menor que a pH cercanos a la neutralidad, fig. 114b.

La variación de la intensidad de pico con respecto al tiempo se representa en la figura 115 para ilustrar lo expuesto anteriormente. En ella se ve claramente la influencia de la agitación en el proceso. Los picos que se han elegido como representativos, $i_{p_1}(\text{MT})$ y $i_{p}(\text{CdT}')$, presentan una evolución análoga en ambos casos pero el fenómeno es más rápido con agitación.

- Cálculo de los pK'

Al igual que se realizó en el apartado de las adiciones patrón se ha realizado el cálculo de las constantes de estabilidad aparentes de los complejos Cd-T y Cd-T' en cada uno de los casos, los valores obtenidos se muestran en la tabla 27.

Si comparamos con los valores de pK' obtenidos para los complejos de Cd-T y Cd-T' que se formaban como consecuencia de las adiciones patrón de ZnCl_2 , que oscilaron entre 7.79 y 3.45-3.66 respectivamente, se puede comprobar que son valores análogos, lo que indica que el complejo Cd-T' que se forma en ambos casos presenta una estructura y comportamiento electroquímico similar.

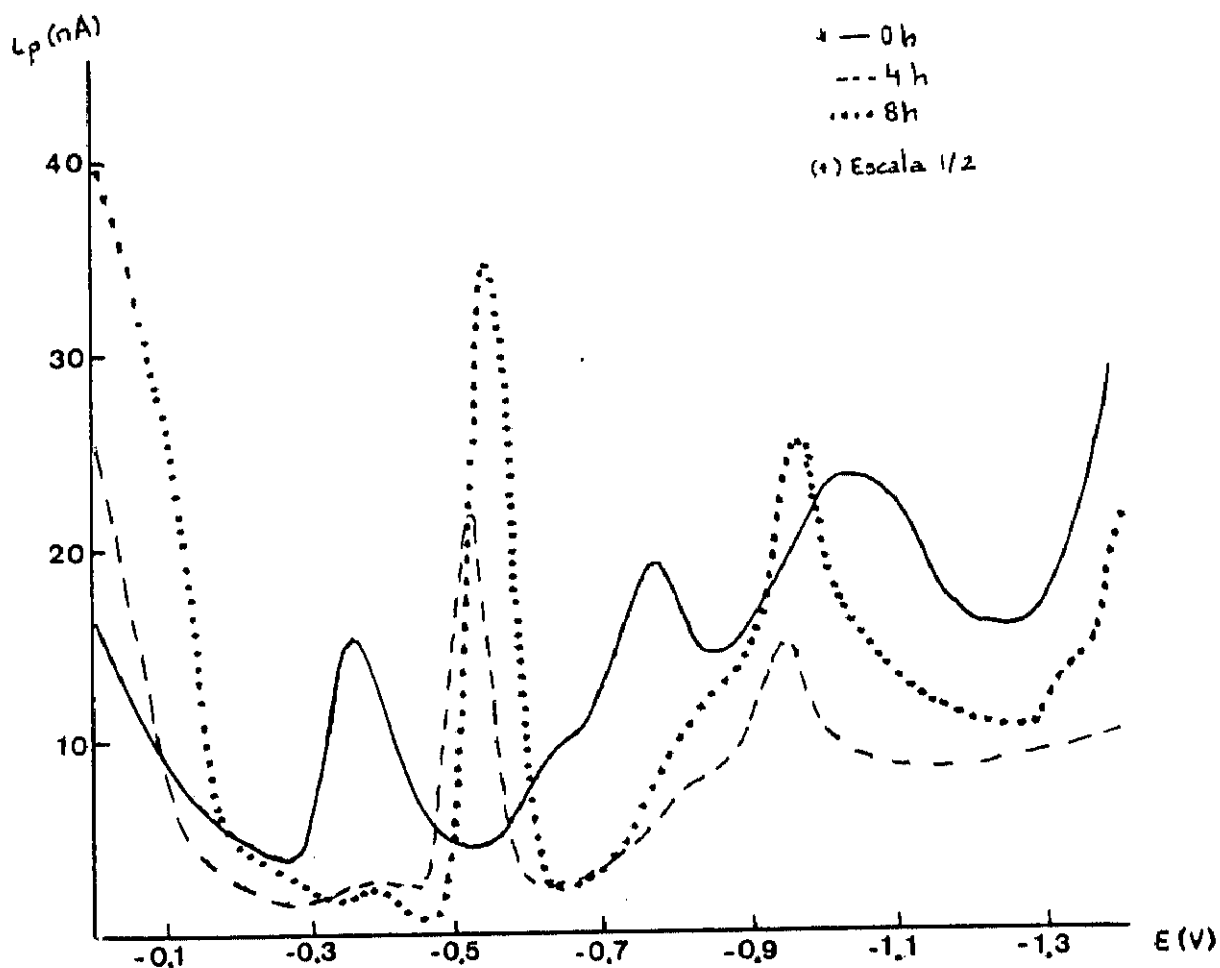


Fig. 114. Evolución de los „polarogramas en D.P.P. de una disolución $7.69 \cdot 10^{-7}$ M de una metalotioneína "horse kidney", preparada en tampón TRIS HCl $2.5 \cdot 10^{-4}$ M de pH 7.5, en función del tiempo y con energética agitación en los intervalos interlecturas.

Influencia de la agitación

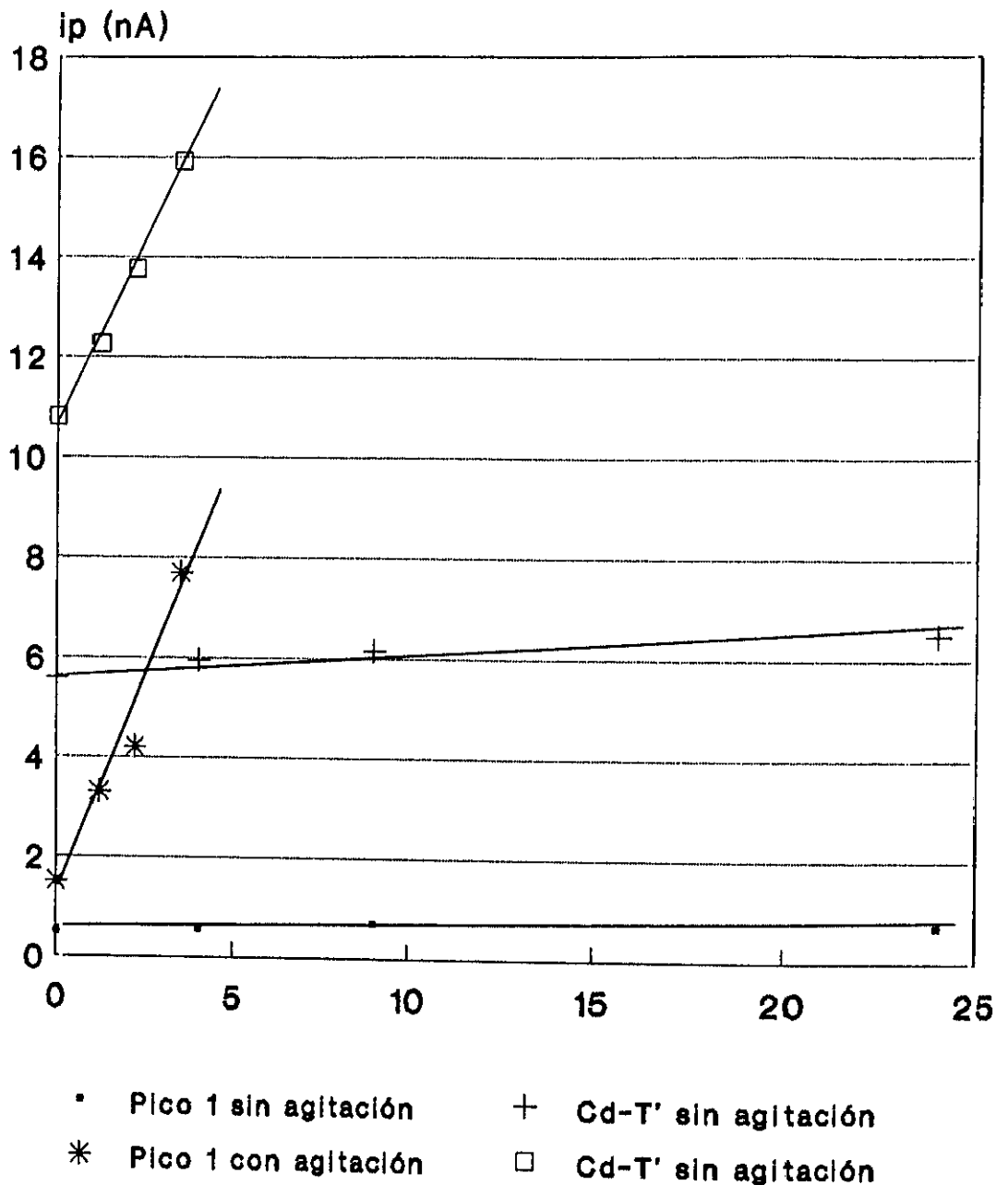


Fig. 115. Influencia de la agitación sobre la intensidad del primer pico y del pico atribuido al complejo Cd-T' de una disolución $7.69 \cdot 10^{-7}$ M de una metalotioneína, preparada en tampón TRIS HCl $2.5 \cdot 10^{-2}$ M de pH 7.5, en función del tiempo.

Tabla 27. Valores de las constantes aparentes de estabilidad para los complejos Cd-T y Cd-T' en función del pH de la disolución de TRIS·HCl

TRIS·HCl	Cd-T		Cd-T'	
ENSAYO	$E(E_{CdT}-E_{Cd})$ en V	pK' Cd-T	$E(E_{CdT'}-E_{Cd})$ en V	pK' Cd-T'
sin agitación	0.23	7.93	0.11	3.79
periodos cortos MT r.l.	0.21	7.24	0.10	3.45
periodos cortos MT h.k.	0.21	7.24	0.10	3.45
pH=10.0	0.25	8.62	0.13	4.48

b) Redisolución anódica

La técnica de redisolución anódica, con una etapa de preconcentración en el electrodo, se ha utilizado con el objeto de obtener información respecto a la estabilidad polarográfica de la MT y, en particular, para elucidar el fenómeno de adsorción de este compuesto en un electrodo de mercurio. Como se ha indicado en la parte experimental de este capítulo, la etapa de preconcentración se realiza en una gota pendiente de mercurio, de un tamaño determinado, a la que se aplica un potencial dado. La redisolución de los compuestos reducidos en la gota se realiza cuando se hace un barrido de potencial en sentido contrario a las experiencias realizadas precedentemente, que van de potenciales negativos a potenciales más positivos. En todos los casos, para la redisolución se emplea la técnica de D.P.S. en las mismas condiciones en que se ha aplicado previamente.

La figura 116 muestra un polarograma de D.P.P. y otro de D.P.S. En este caso el orden de los picos están invertidos, como se observa en la figura. En ella se muestran, así mismo, un polarograma D.P.S. de los cationes libres.

Si se comparan los picos en oxidación y reducción (fig. 116 a y b respectivamente) se puede constatar, como un hecho importante, que la diferencia de potencial entre el segundo pico y el pico del cadmio libre $\Delta E(2'-Cd^{2+})$ (a), en oxidación aproximadamente 0.120 V es similar a la diferencia de potencial en reducción, entre $\Delta E(2'-Cd^{2+})$ (b) próximo a 0.120V y diferente de $\Delta E(2-Cd^{2+})$ que es 0.250 V, es decir el pico que aparece en oxidación corresponde al complejo de cadmio denominado $Cd-T'$, menos estable. Si se admite que la especie que se reduce a ese potencial es el cadmio $Cd(II) \rightarrow Cd(0)Hg$, durante el proceso anódico se producirá la reoxidación $Cd(Hg) \rightarrow Cd^{2+}$, en presencia de metalotioneínas en disolución, el complejo que se forma prioritariamente es el $Cd-T'$.

c) Estabilidad en D.P.S.

Por otra parte la evolución de los polarogramas en función del tiempo (fig. 117 a y b) muestra que el cadmio se libera progresivamente de la MT.

La representación gráfica de $ip(CdT')$, e $ip(Cd^{2+})$ se ilustra en la figura 118. En ella se ve claramente la liberación del cadmio unido a la metalotioneína por el aumento de $ip(Cd^{2+})$ y, análogamente, la destrucción del complejo $Cd-T'$ por disminución de la intensidad correspondiente.

Por otra parte estos polarogramas nos han permitido calcular, de nuevo, la $K'_{CdT'}$. En este caso se parte de una disolución única y de la que se calcula la diferencia de potenciales entre el cadmio libre y el complejo $Cd-T'$, por lo tanto no intervienen posibles errores en la medida debido al ajuste del potencial del

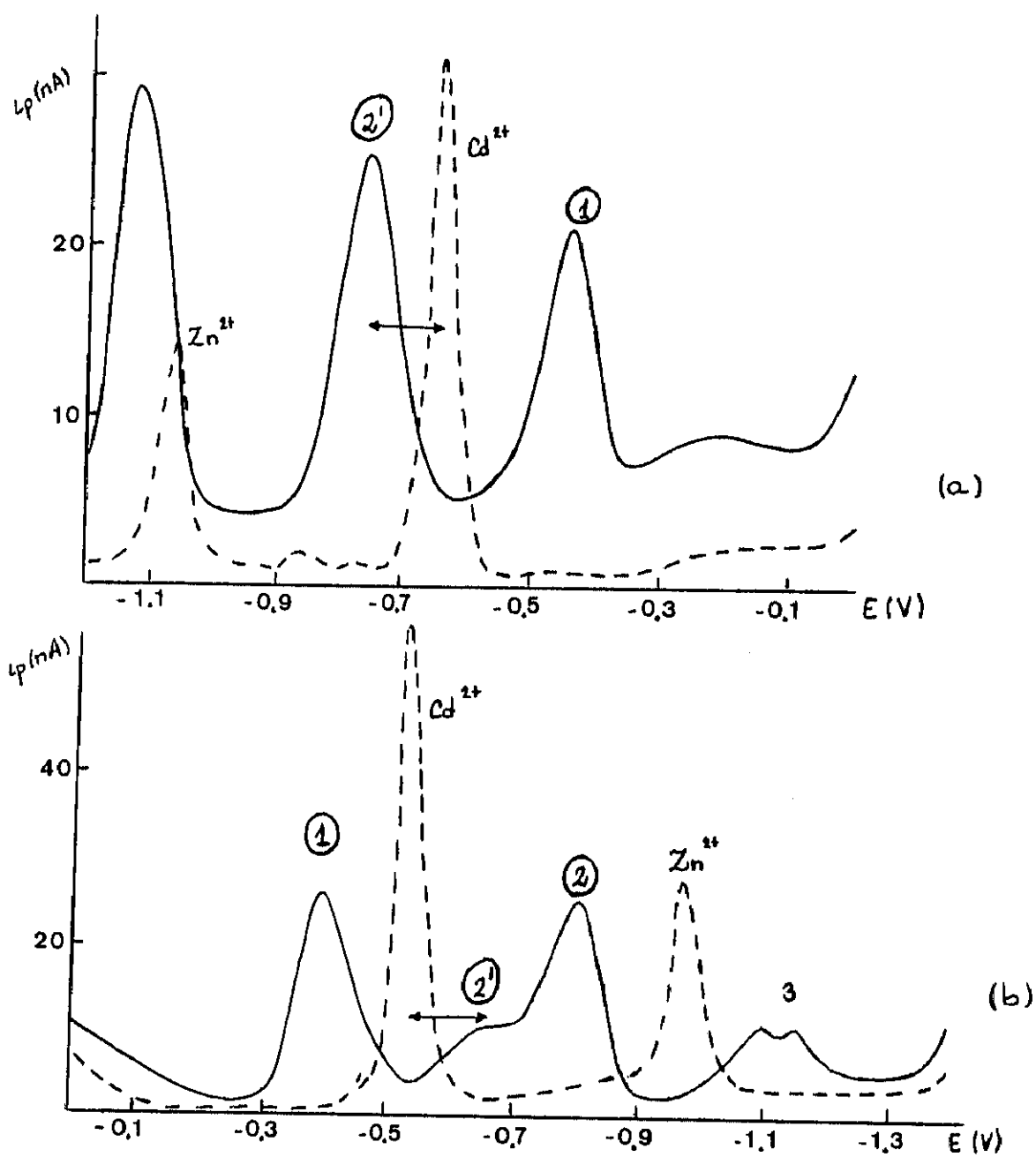
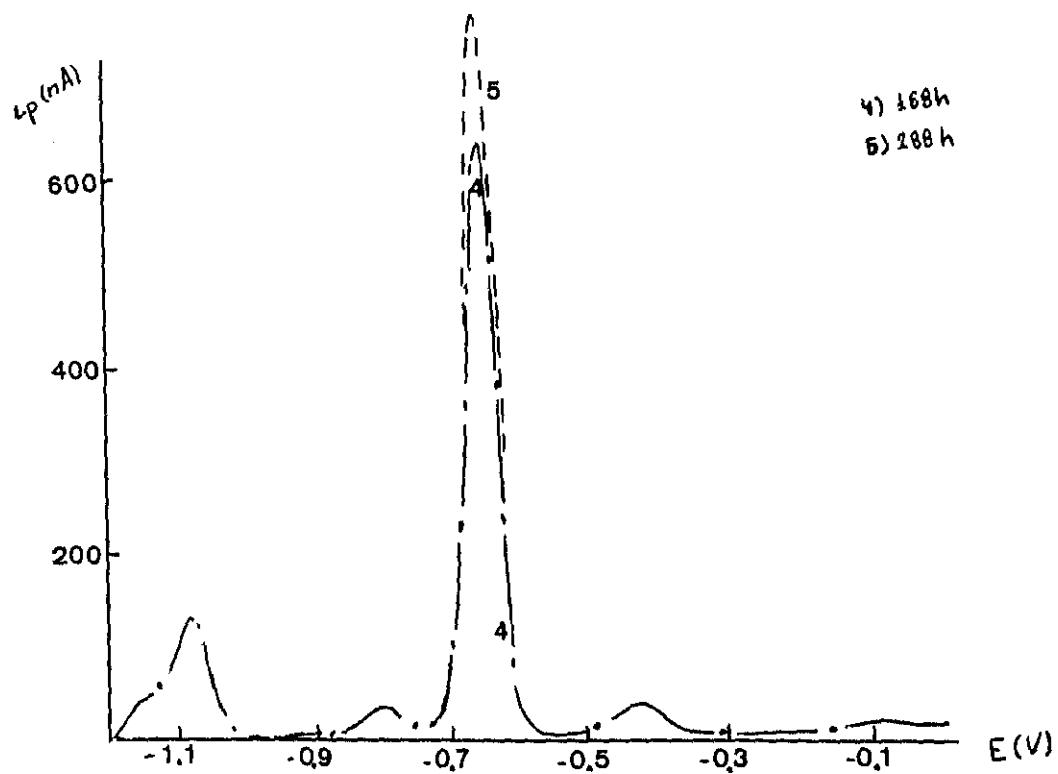
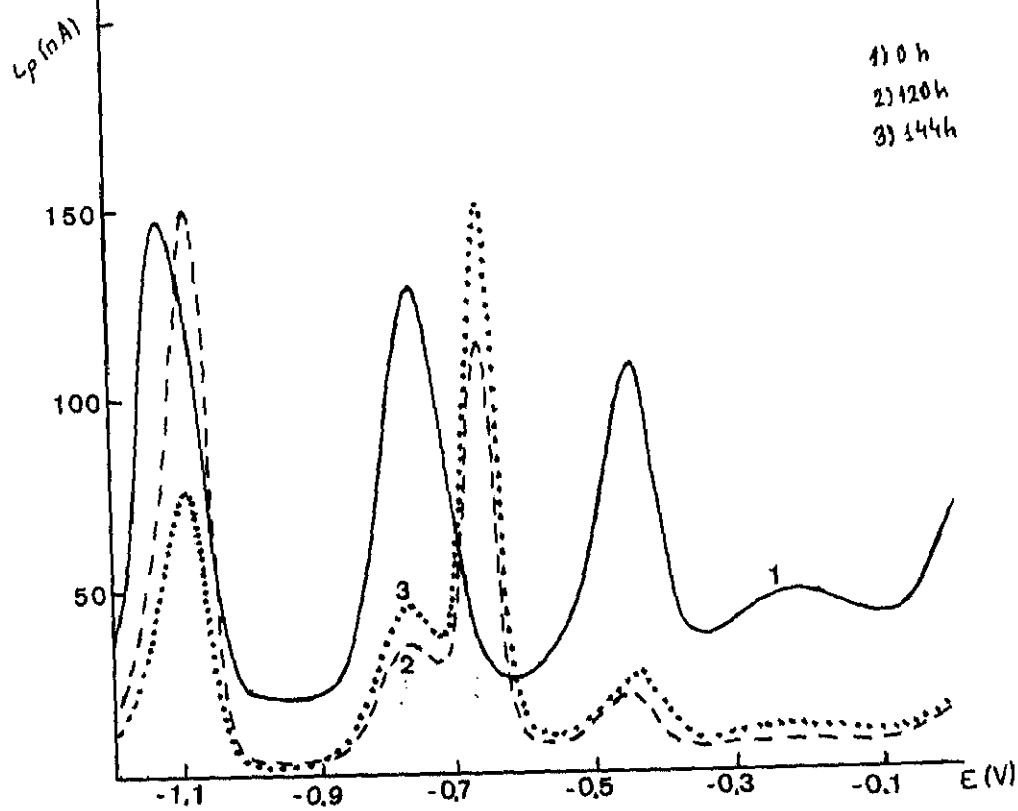


Fig. 116. Polarogramas realizados mediante: (a) D.P.S. y (b) D.P.P., de una disolución $7.69 \cdot 10^{-7}$ M de una metalotioneína, preparada en tampón TRIS HCl $2.5 \cdot 10^{-2}$ M de pH 7.5.

Fig. 117. Evolución en función del tiempo mediante D.P.S. de una disolución $7.69 \cdot 10^{-5}$ M de una metalotioneína, preparada en tampón TRIS HCl $2.5 \cdot 10^{-3}$ M de pH 7.5.



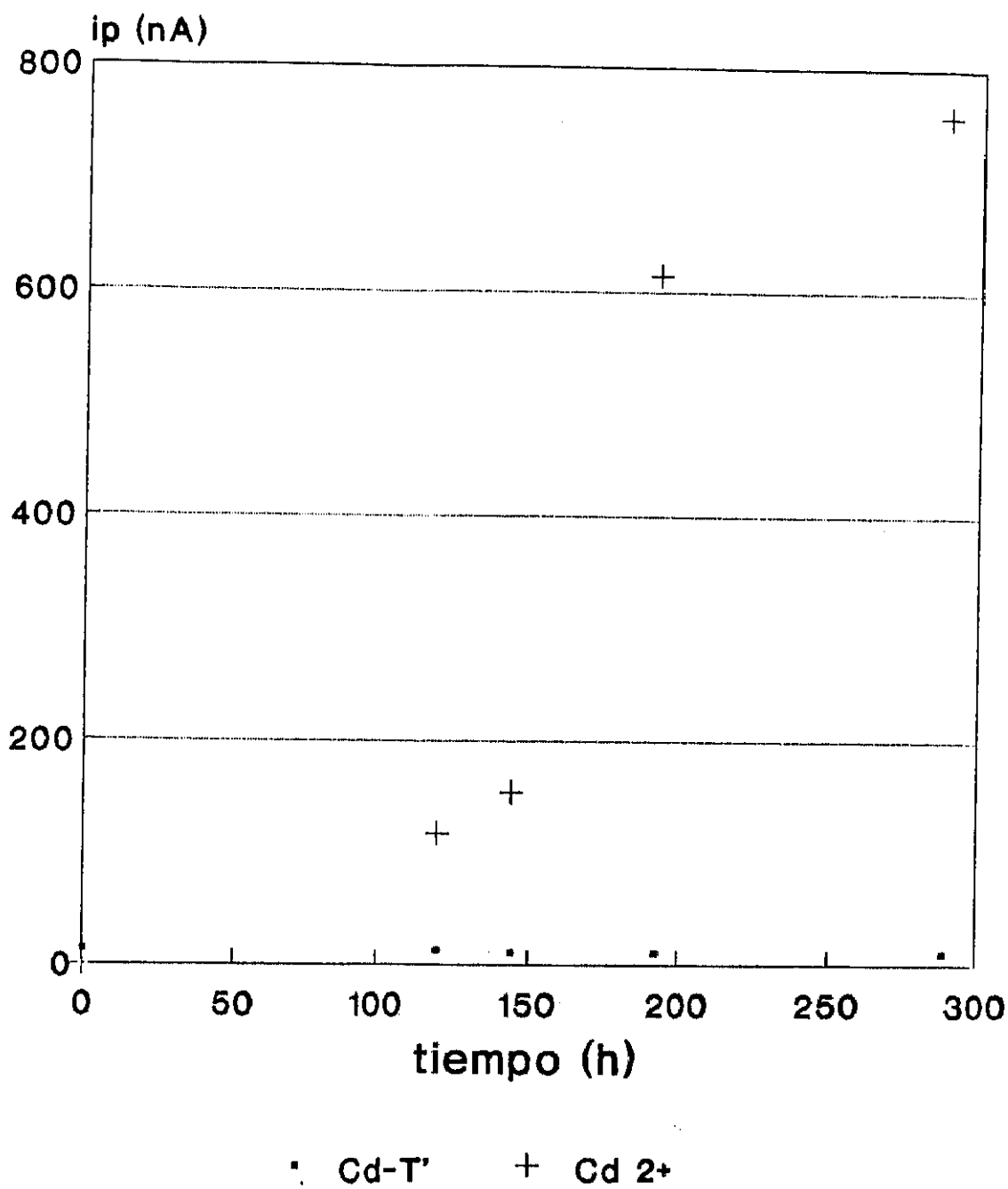


Fig. 118. Representación de la variación de la intensidad del primer pico y del pico correspondiente al complejo Cd-T' , obtenidos mediante D.P.S., en función del tiempo transcurrido.

equipo utilizado. El valor de pK' obtenido en este caso es 3.45, valor igual al obtenido anteriormente.

En este caso conviene señalar que tras la lectura a tiempo cero, en el seno de la cubeta existe mercurio, lo que podría producir un equilibrio químico entre el cadmio y el mercurio de la superficie oxidado por la metalotioneína.

V.C.1.E. INFLUENCIA DE LOS FENOMENOS DE ADSORCION

Como ya se ha indicado, los procesos de adsorción en el electrodo de los compuestos orgánicos con grupos tiólicos tienen una gran importancia, en particular cuando el contacto con la gota es importante, es decir cuando se emplea gota pendiente. La polarografía por redisolución confirma que estos fenómenos están al menos superpuestos, durante el proceso electroquímico. En efecto, se han realizado tres ensayos diferentes (fig. 119). Para una concentración dada de metalotioneína se realiza un polarograma en polarografía de impulsos diferencial (fig. 119 a), en voltametría de redisolución anódica imponiendo un potencial, $E_d = -1.2$ V durante 60s (fig. 119 b) y voltametría de redisolución anódica sin imponer ningún potencial en la que se mantiene la disolución en contacto con la gota durante 5 min. (fig. 119 c). Al comparar la altura de los picos para una misma concentración de MT en un medio dado, obtenidos por polarografía diferencial de impulsos y por redisolución anódica, en esta última con una etapa de preconcentración previa, se observa que las intensidades son similares, en particular para los picos atribuidos a la tioneína $E_p = -0.40$ V y el complejo Cd-T a $E_p = -0.70$ V (fig. 119 a) lo que indica que el fenómeno de preconcentración, que implica la etapa de depósito en el electrodo, producido imponiendo un potencial al electrodo no es significativo (fig. 119 a y b). Así mismo, este fenómeno se ha comprobado realizando el polarograma de oxidación (fig. 119 c) sin imponer ningún potencial. La señal obtenida es similar a la que se obtiene imponiendo un potencial.

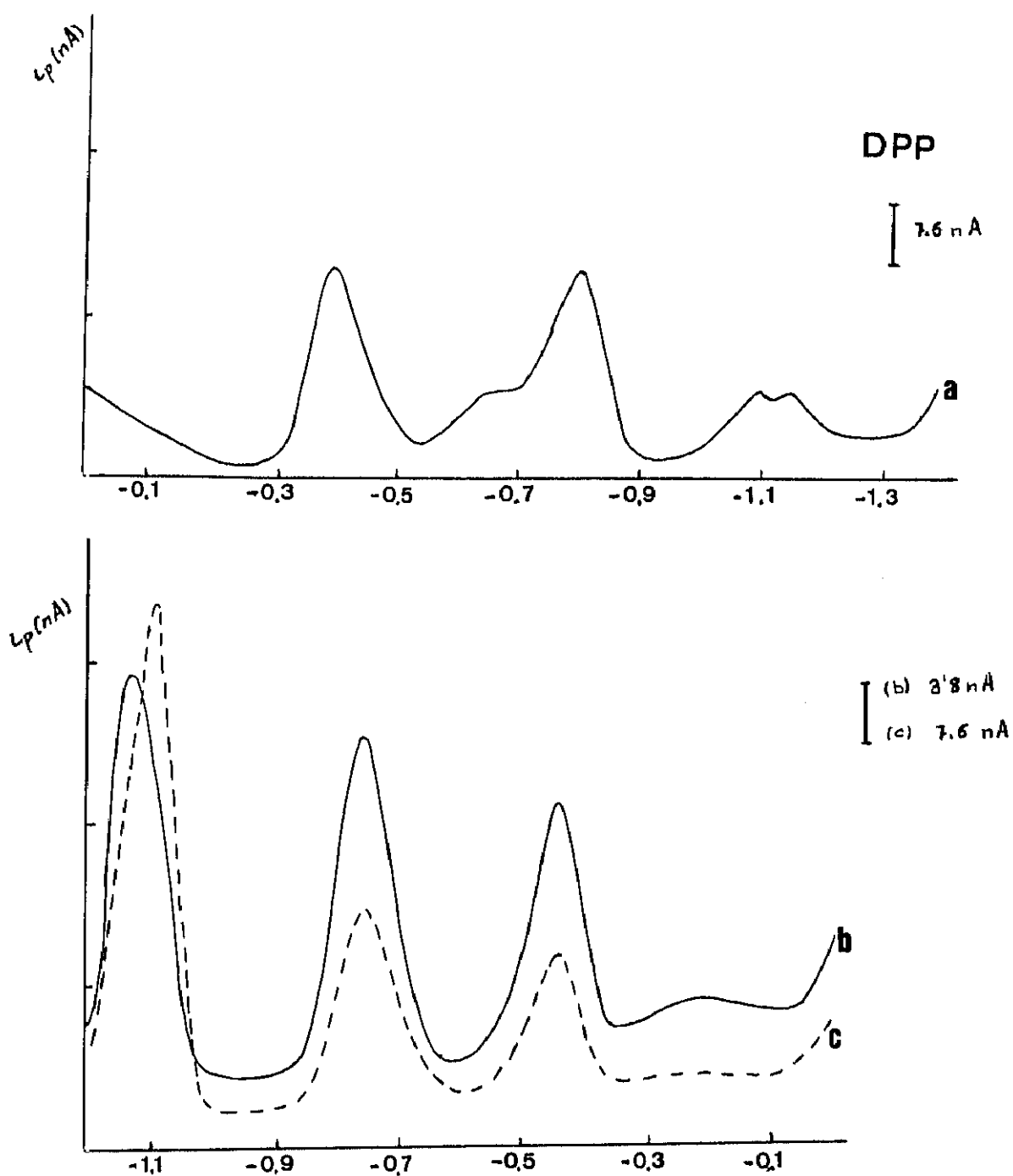


Fig. 119. Polarogramas de una disolución de MT "rabbit liver", $7.69 \cdot 10^{-7}$ M en TRIS HCl $2.5 \cdot 10^{-2}$ M obtenidos mediante: (a) D.P.P., (b) D.P.S. imponiendo un potencial y (c) D.P.S. sin imponer un potencial.

El proceso de adsorción y de evolución del compuesto se ilustra, así mismo, en condiciones drásticas de tiempo y potencial. Si se impone un potencial de -1.200 V y se deja la disolución en contacto con el electrodo durante 14 horas, se obtiene el polarograma de la figura 120 con intensidades elevadas. Cabe indicar que la relación de concentraciones de cadmio y zinc de la muestra es aproximadamente 3, la misma que la existente entre la relación entre las intensidades de los picos $i_{p_1}/i_{p_3}=3.4$. Por lo tanto, puede decirse que la señal se debe a los cationes presentes en la MT. La señal que se observa en este polarograma presenta una intensidad mucho mayor a las anteriores debido a que el tiempo de depósito sobre la superficie de mercurio ha sido muy elevado y por tanto la respuesta no es comparable con casos anteriores. En este caso la respuesta polarográfica con respecto a lo anteriormente expuesto (fig. 119 b) está multiplicada por un factor 10^3 . En este caso la metalotioneína se descompone completamente y aparece la amalgama $M(\text{Hg})$ de los cationes en su totalidad que difunden en el interior de la gota. Parece ser que la metalotioneína va a la gota, se descompone y el metal se amalgama con el mercurio independientemente del recubrimiento de la superficie.

a) Altura de pico en función del tiempo de depósito

Se ha realizado un estudio de la influencia del tiempo de depósito en redisolución anódica para dos pH diferentes, $\text{pH}=2.0$ y $\text{pH}=7.5$. En un proceso electroquímico simple la altura de pico debe ser proporcional al tiempo de electrolisis, al menos para tiempos pequeños. Las variaciones correspondientes a la intensidad de los picos, están dadas en la figura 121 a y b. Para $\text{pH}=2$ el pico del catión zinc libre no está bien definido ya que a pH ácido está más limitado por el D.E.A. del disolvente. Para $\text{pH } 7.5$ la intensidad del pico atribuido a T y del Cd-T' no varía en el intervalo de tiempo de depósito estudiado, lo que implica que el tiempo de electrolisis no influye en la cantidad electrolizada en el electrodo. Esto parece indicar que el

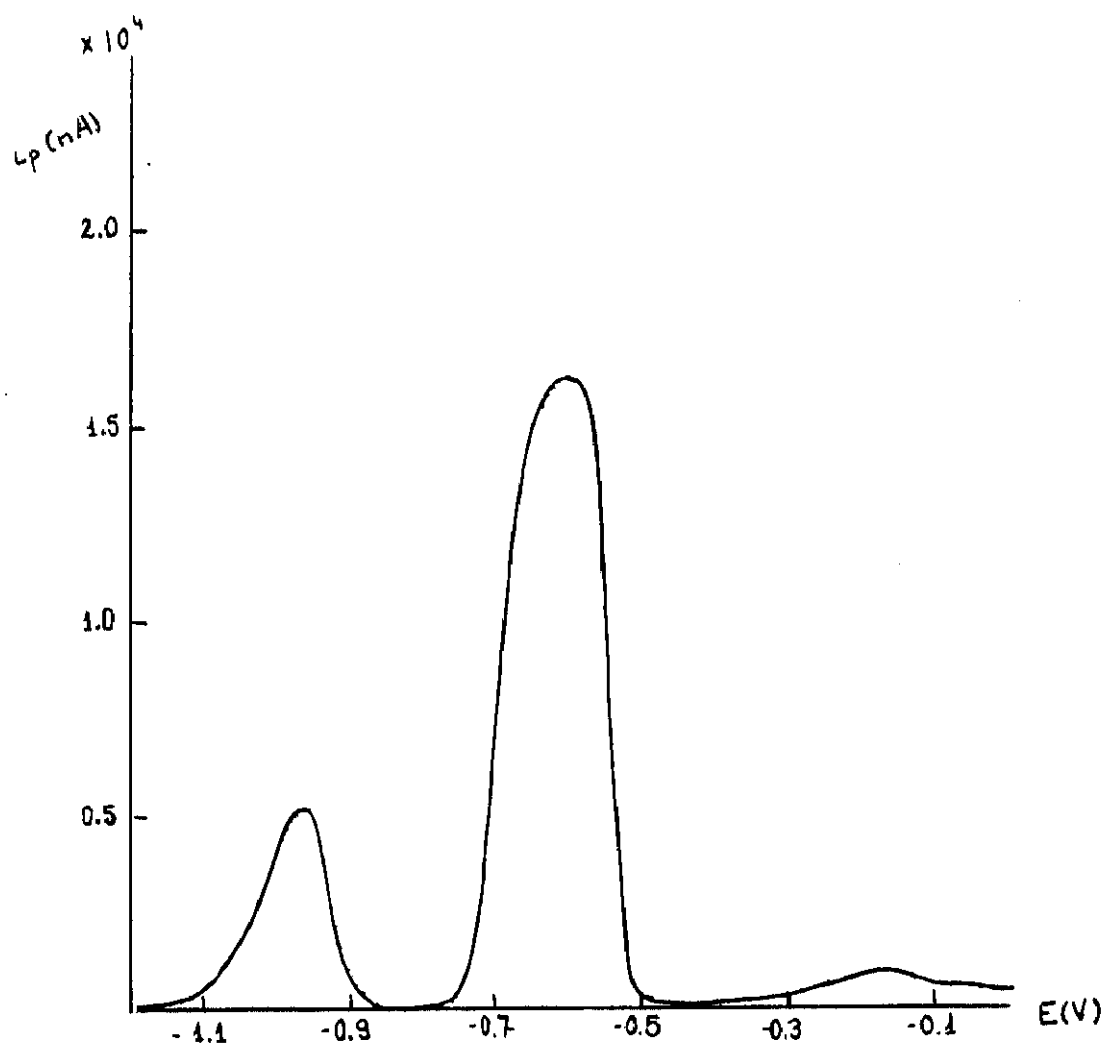
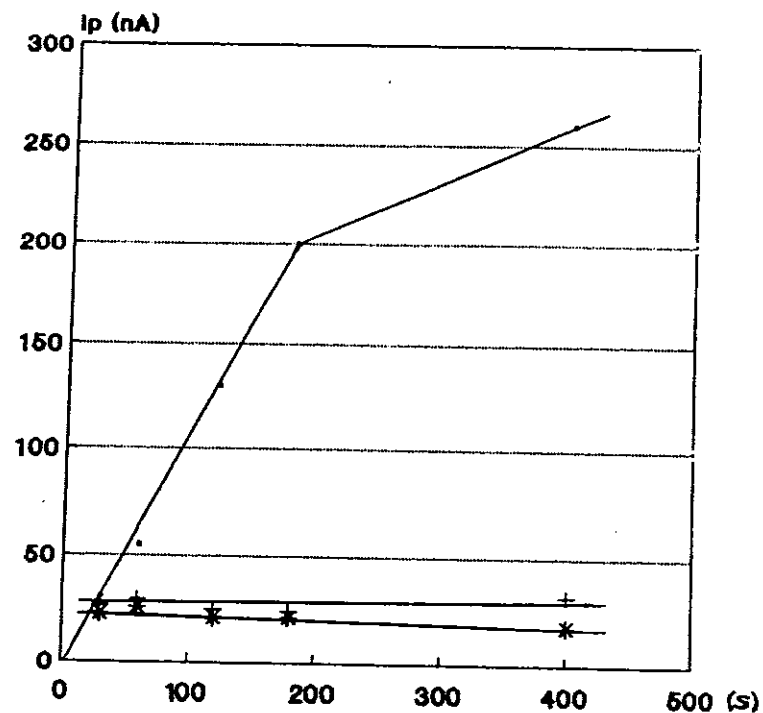


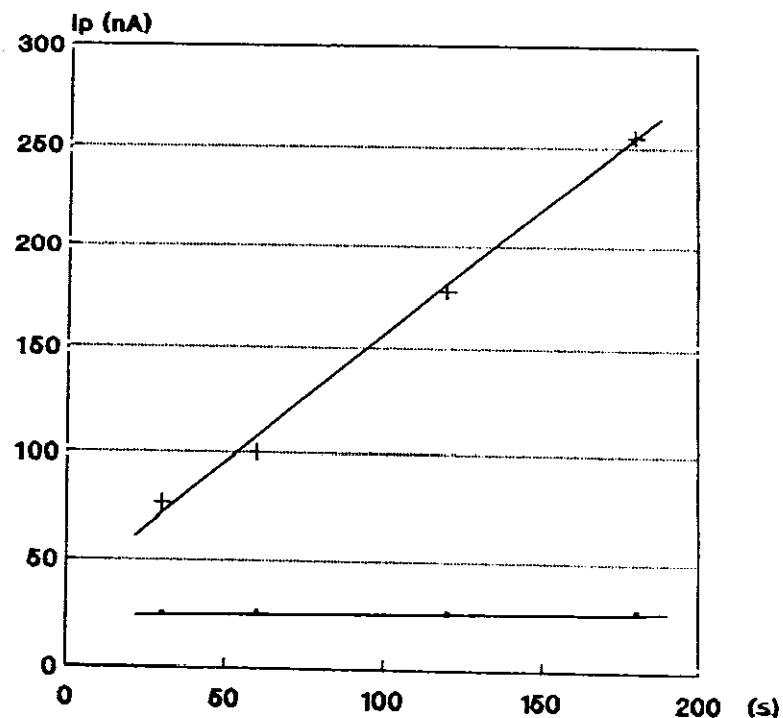
Fig. 120. Polarogramas de una disolución de MT "rabbit liver", $7.69 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ en TRIS HCl $2.5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ obtenidos mediante D.P.S. cuando: $\Delta E = 50 \text{ mV}$, $v = 2 \text{ mV/s}$, potencial impuesto = -1.2 V y tiempo de depósito = toda la noche.

Influencia del tiempo de depósito
pH = 7.5



• Pico 1 + Cd-T * Zn-T

Influencia del tiempo de depósito
pH = 2.0



• Pico 1 + Cd (II)

Fig. 121. Influencia del tiempo de depósito sobre una disolución de MT "rabbit liver", $7.69 \cdot 10^{-2}$ M, obtenidos mediante D.P.S., en TRIS HCl $2.5 \cdot 10^{-2}$ M a dos pH diferentes: 7.5 y 2.0

fenómeno de adsorción en la superficie es el que rige el proceso y que la gota de mercurio se encuentra saturada en su superficie de contacto con la disolución. Por el contrario, para la Zn-T la variación de la señal en función del tiempo de depósito, $i_p=f(t_d)$ es lineal como cabe esperar para un proceso electroquímico simple hasta tiempos de depósito relativamente grandes, tres minutos. Esta experiencia confirma la hipótesis ya enunciada en otras ocasiones que el comportamiento electroquímico del complejo tioneína de zinc es diferente que el de la tioneína de cadmio. Sin embargo a pH=2.0, existe una relación lineal entre el tiempo de depósito y la intensidad de señal para el catión cadmio libre, como cabe esperar para los cationes libres en disolución.

Por otra parte, si se comparan los polarogramas realizados exactamente en las mismas condiciones experimentales y para una misma concentración de producto a pH 2.0 y a pH 7.5 (fig. 122) se observa que la altura de pico atribuido a la reducción de la apotioneína es mucho mayor a pH ácido que neutro. La relación entre las alturas de pico en D.P.S., $i_{p_{INT}}(pH=2)/i_{p_{INT}}(pH=7.5)$ es 7. Si se compara con lo encontrado anteriormente por D.P.P. en condiciones análogas $i_{p_T}(pH=2)/i_{p_T}(pH=7.5)=0.5$, se observa que hay una inversión de la respuesta polarográfica y que seguramente la forma química de las especies, protonada o no, debe influir. No se encuentra ninguna explicación ni hipótesis para explicar este fenómeno. Seguramente se trate de procesos diferentes en oxidación y reducción, en oxidación predomina la adsorción, mientras que en reducción la difusión estacionaria. Por este motivo a pH ácidos, en que los grupos tiólicos están protonados y libres de su unión a cationes, lo que provoca una apertura de la cadena polipeptídica, esté favorecida la interacción del grupo tiólico con el electrodo de mercurio y se produce el complejo intermedio, mercurio-tiolato adsorbido propuesto por Bard, con mayor facilidad que a pH básicos en que los grupos tiólicos están asociados a cationes y hacia el interior de la molécula. Por el contrario, nosotros proponemos que en polarografía diferencial rige el proceso de difusión que se verá facilitado cuando la

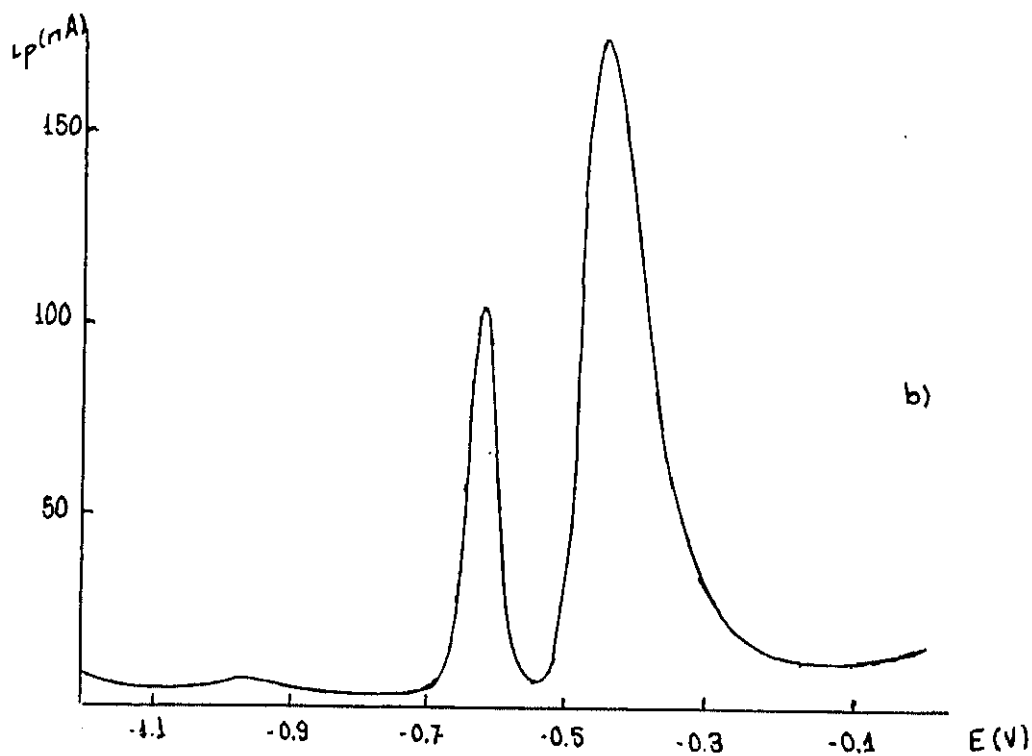
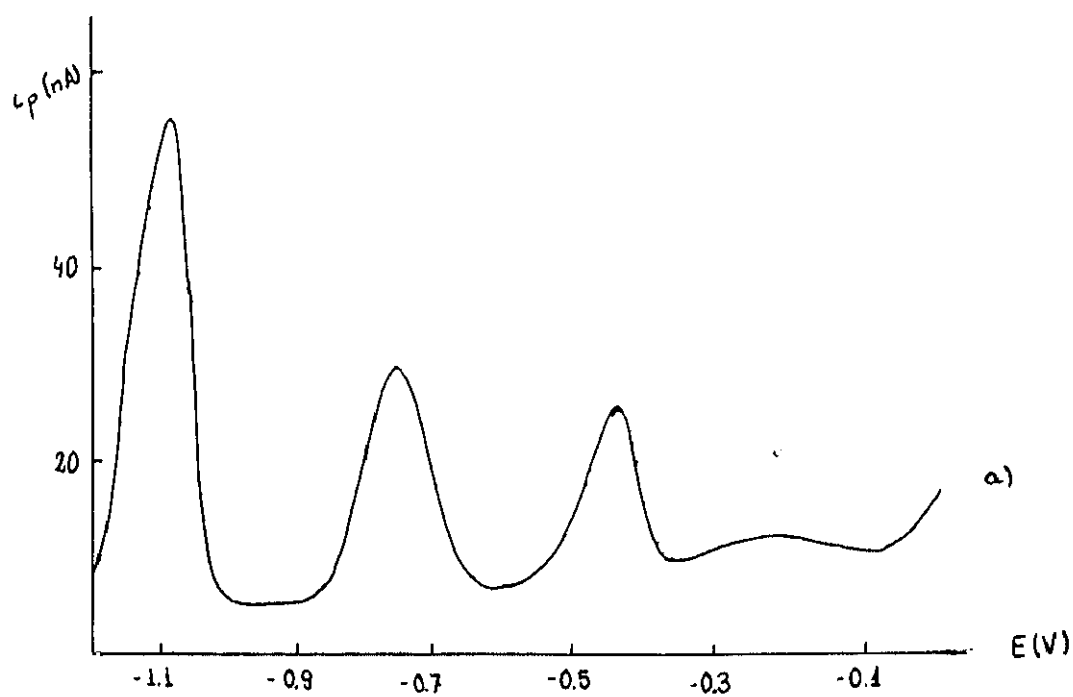


Fig. 122. Polarogramas realizados mediante D.P.S. (tiempo de depósito = 60 s) de una disolución de MT "rabbit liver", $7.69 \cdot 10^{-7}$ M, en TRIS HCl $2.5 \cdot 10^{-2}$ M a dos pH diferentes: (a) 7.5 y (b) 2.0

molécula asociada a cationes presente un diámetro mucho menor al no estar extendida la cadena peptídica.

b) Influencia del tamaño de gota

El fenómeno de adsorción probablemente es importante en voltametría de redisolución anódica con gota pendiente, de las metalotioneínas. Si esto es así, el área de la gota juega un papel importante en el proceso. Para el estudio de la influencia de la superficie de contacto de la metalotioneína con el electrodo de mercurio se empleó la redisolución anódica y se hizo variar la superficie de la gota de mercurio del electrodo, para ello se partió de la misma disolución de MT preparada a los dos pH indicados en el caso anterior, 7.5 y 2.0.

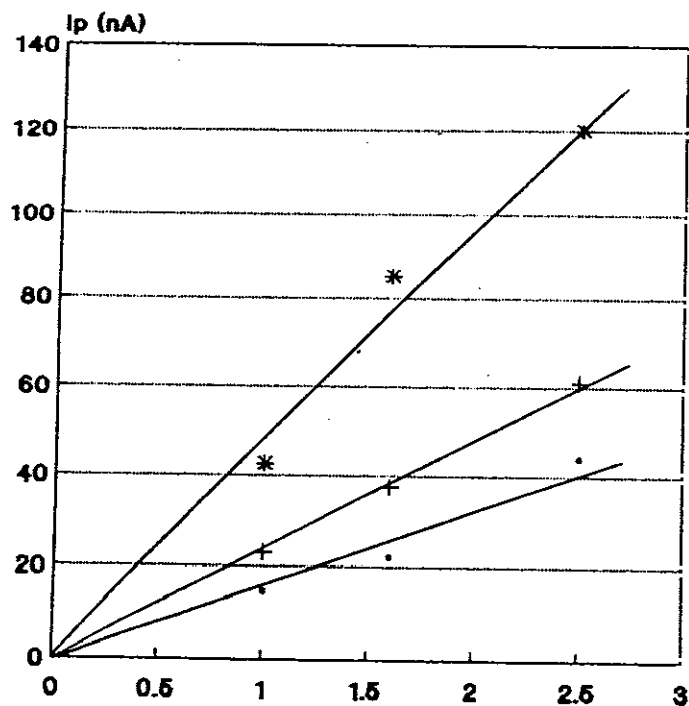
Los resultados obtenidos se muestran en la figura 123. En ella se puede comprobar como existe una relación lineal entre la señal obtenida y el área de la gota para un mismo tiempo de depósito, por lo tanto, este es un factor importante.

A pH=7.5 se observan los tres picos bien definidos, mientras que a pH=2.0 el pico del zinc no se puede determinar.

Por lo tanto, es posible que los fenómenos de adsorción, en estas condiciones sean preponderantes sobre los de difusión.

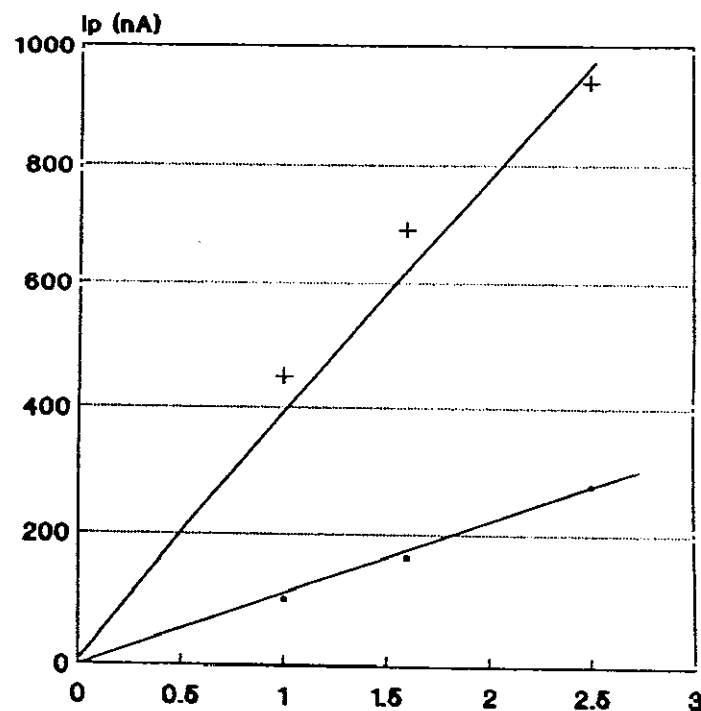
También se puede señalar que en voltametría de redisolución anódica, como se observa claramente en las figuras 122 a y b, que la señal debida al primer pico, para una misma concentración se encuentra exaltada a pH ácido y, para unas condiciones dadas la relación existente entre $i_{p_{\text{MT}}}(\text{pH}=2)$ e $i_{p_{\text{MT}}}(\text{pH}=7.5)$ es aproximadamente de 7, como ya se ha indicado en el apartado anterior.

Influencia del area de la gota
pH 7.5



• Pico 1 + Cd-T * Zn-T

Influencia del area de la gota
pH 2.0



• Pico 1 + Cd(II)

Fig. 123. Influencia del area de la gota en D.P.S. (tiempo de depósito = 60 s) de una disolución de MT "rabbit liver", $7.69 \cdot 10^{-7}$ M, en TRIS HCl $2.5 \cdot 10^{-2}$ M a dos pH diferentes: (a) 7.5 y (b) 2.0

V.C.1.F. ESTUDIOS SOBRE LA INTENSIDAD DE LA SEÑAL EN FUNCION DE LA CONCENTRACION

La polarografía diferencial de impulso se puede proponer como método cuantitativo que permite la determinación de las metalotioneínas y conocer la cantidad de cadmio y zinc que se encuentran asociados.

Tal y como se ha indicado en la introducción de este capítulo, el método electroquímico comunmente empleado para la determinación de las MT, en cuanto a su parte orgánica se refiere es el método de Brdicka (1,24-30). Otros métodos electroquímicos directos sólo se han empleado para valorar la cantidad de MT inducida por diversos agentes, es decir, valoraciones relativas (24,29).

Con frecuencia con los métodos empleados en la determinación cuantitativa de este tipo de compuestos se obtiene una señal que depende del origen de la MT (24). Con el objeto de comparar la respuesta polarográfica se ha medido la intensidad de pico en D.P.P. de cada uno de los tres picos en función de la concentración del producto para las cinco metalotioneínas comercialmente disponibles. Estas metalotioneínas son de diferente origen, hígado de conejo y riñon de caballo y contienen, o bien la mezcla de dos isoformas o cada una de ellas por separado (I, II). La intensidad de pico debe depender, por una parte, de los grupos tiólicos de la parte orgánica de la MT y, por otra, de la concentración de cationes metálicos asociados a esos grupos. Por esa razón se muestran varias representaciones gráficas para cada uno de los picos obtenidos, $ip_1(MT)$, $ip_{Cd-T}(MT)$ y $ip_{Cd-T}(MT)$ en función de la concentración total del producto y de la concentración total de cada uno de los cationes, cadmio o zinc y de la suma de las concentraciones de cadmio y zinc. Así mismo, se representa $ip_1(MT)$ en función de tres veces la cantidad total de metales, $3(Cd+Zn)$ y de la concentración de cadmio más zinc dividida entre siete, $(Cd+Zn)/7$. La primera se toma ya que cada catión metálico divalente se encuentra asociado a tres

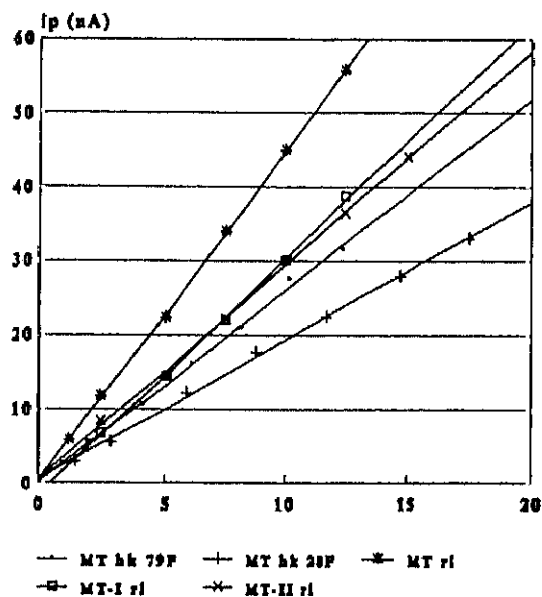
azufres tiólicos pertenecientes a otras tantas cisteínas, por lo tanto, lo que se pretende es relacionar la intensidad de cada pico con el contenido en cisteínas asociadas. La segunda se justifica en función de la cantidad de metalotioneína que debería existir si ésta se encontrase saturada. En efecto, en la literatura se indica que las MT deben estar saturadas y que existen siete moles de catión divalente por mol de metalotioneína. Sin embargo, en las MT que se han utilizado, la concentración total de cationes varía de una MT a otra y esta variación puede ser muy importante, doble una de otra, por lo que es difícil comprender la saturación de todos los grupos tiolato. Sin embargo, esto podría explicarse admitiendo que las MT en el organismo se encuentran saturadas, ya que existe un mecanismo de bioregulación de su síntesis, pero que, en el proceso de extracción, se pierden parte de los metales, lo que hace que las muestras con las que se trabaja no estén totalmente saturadas, sino que la concentración metálica de las mismas varía.

Las experiencias se han llevado a cabo, para una amplia gama de concentraciones, a pH 7.5. Un intervalo más restringido de concentraciones se ha llevado a cabo a pH 2.0. Para este último pH se representa la intensidad del primer pico en función de las diferentes concentraciones, ya que los otros dos picos son debidos al cadmio y zinc libres, Cd^{2+} y Zn^{2+} , por lo tanto, son proporcionales a las concentraciones de cadmio y zinc presentes en las MT.

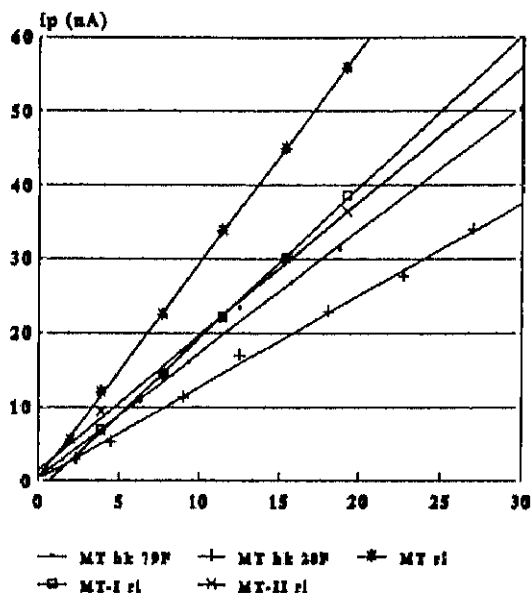
La variación de $i_p=f(c)$ se representa en las figuras 124-128, para pHs 7.5 y 2.0. En las tablas 28-32 se agrupan las pendientes obtenidas para cada una de las representaciones.

Se observa que las variaciones son lineales para todo tipo de representaciones para una tioneína dada, pero que no se encuentra una representación lineal única, lo que cabría esperar, sí, independientemente de su origen, las MT presentan un mismo comportamiento electroquímico.

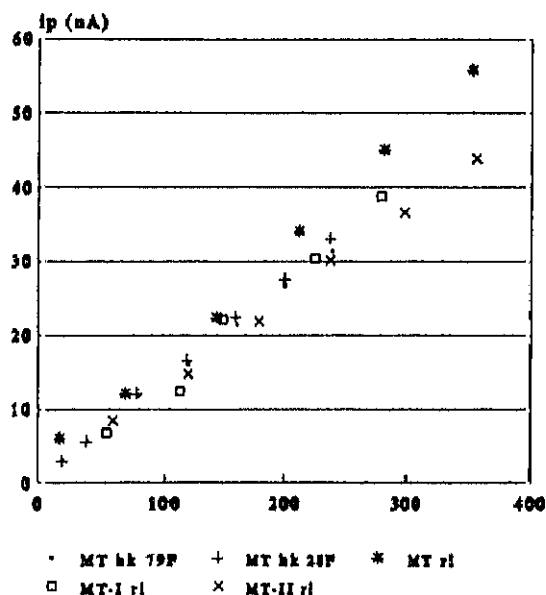
$i_p(1)$ en función de la concentración
producto en g/L



$i_p(1)$ en función de la concentración
molar MT para las 5 MT



$i_p(1)$ en función de tres veces la
concentración molar de cadmio+zinc



$i_p(1)$ en función de siete veces la
concentración molar de tioles ocupados

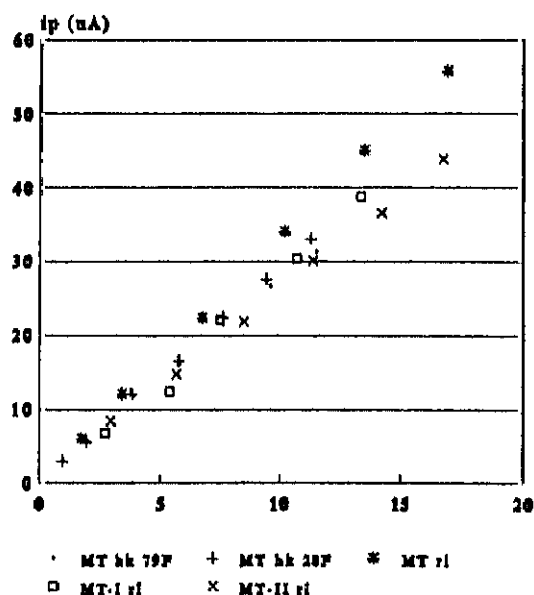
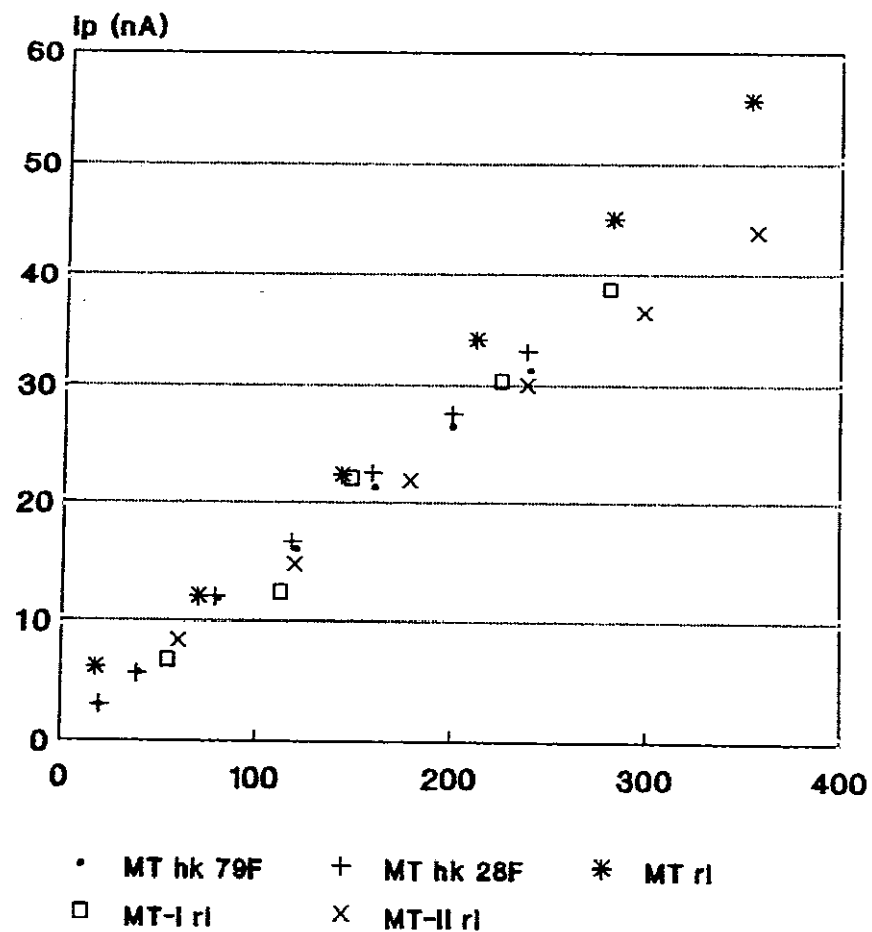
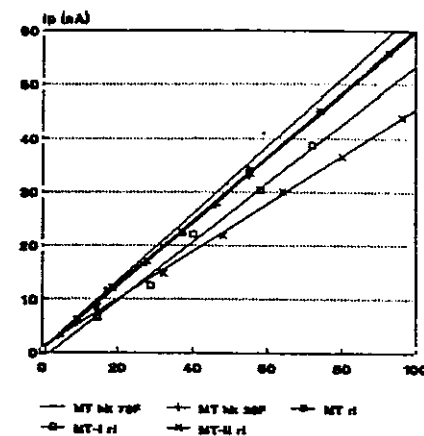


Fig. 124. Intensidad del primer pico en función de la concentración.

ip(1) en función de tres veces la
concentración molar de cadmio+zinc



ip(1) en función de la concentración
molar de cadmio



ip(1) en función de la concentración
molar de zinc

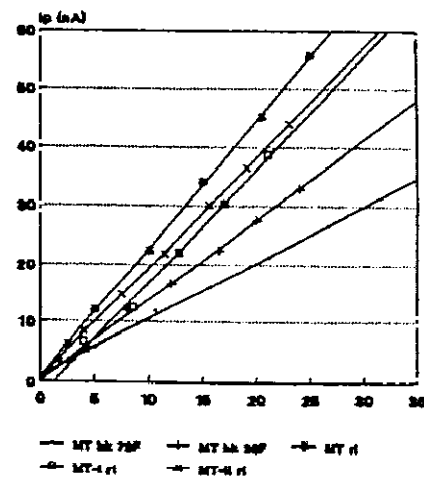
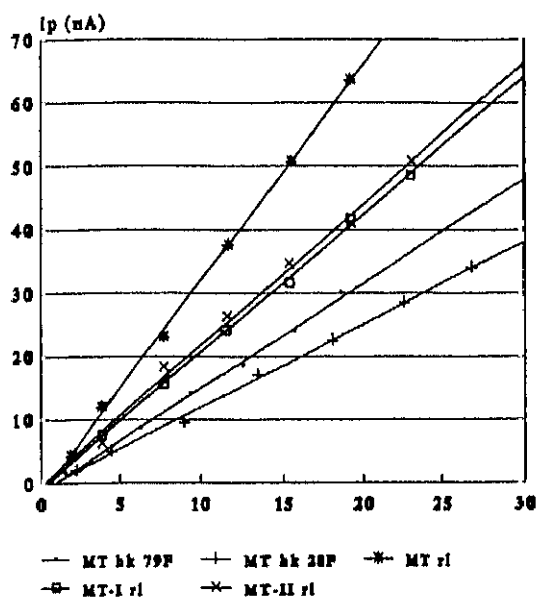
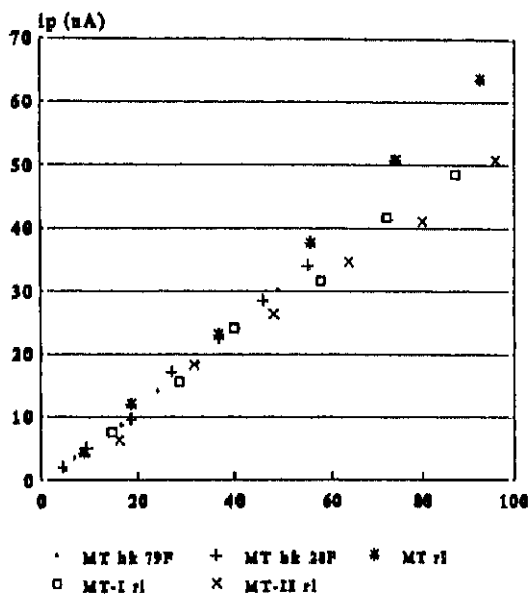


Fig. 125. Intensidad del primer pico en función de la
concentración.

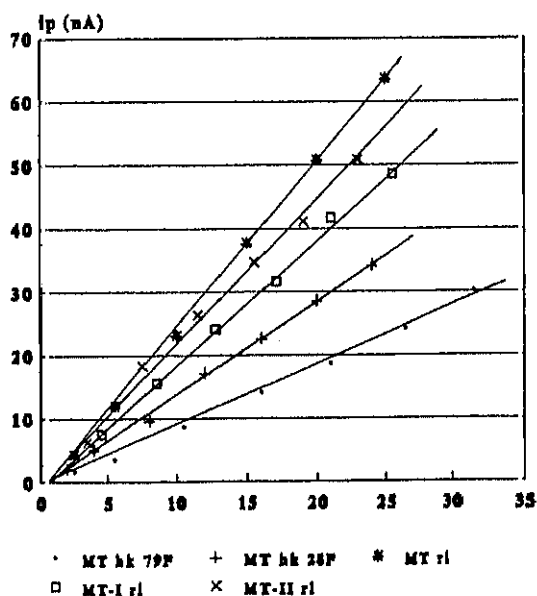
Intensidad $i_p(\text{Cd-T})$ en función de la concentración molar para las 5 MT



Intensidad $i_p(\text{Cd-T})$ en función de la concentración molar de cadmio



Intensidad $i_p(\text{Cd-T})$ en función de la concentración molar de zinc



Intensidad $i_p(\text{Cd-T})$ en función de la concentración molar de cadmio+zinc

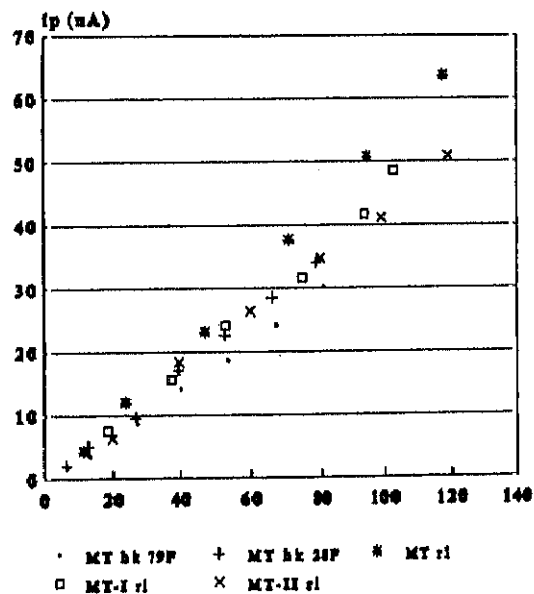
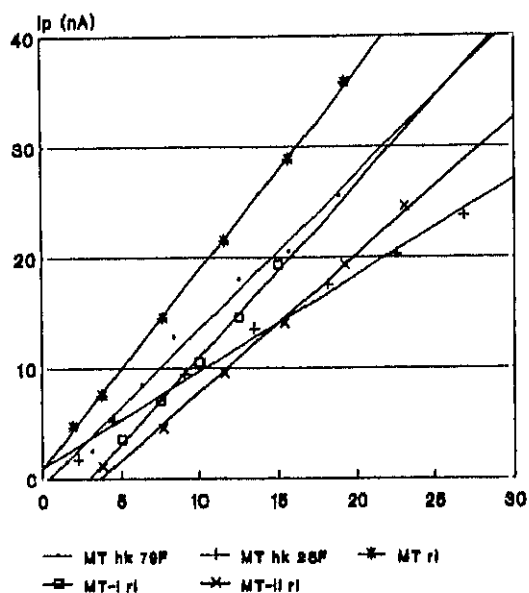
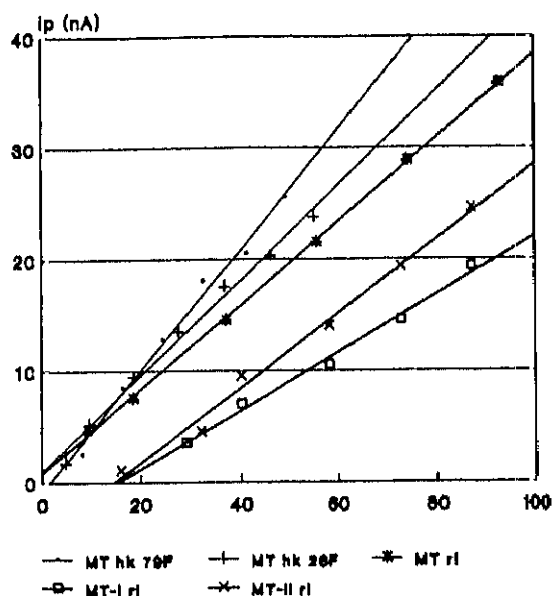


Fig. 126. Intensidad del segundo pico en función de la concentración.

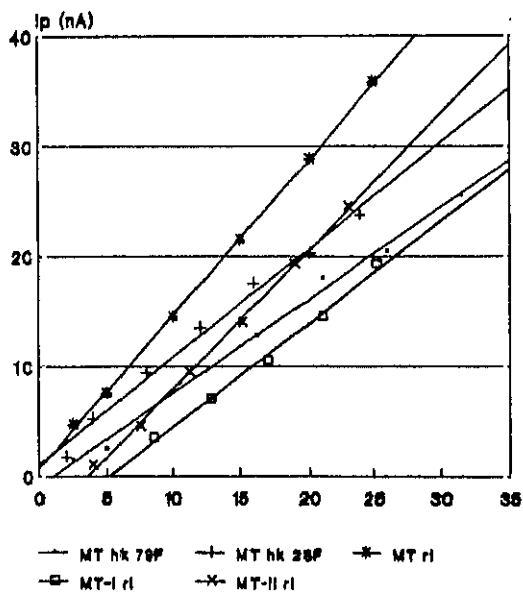
Variación de $i_p(\text{Zn-T})$ en función de la concentración molar de MT



Variación de $i_p(\text{Zn-T})$ en función de la concentración molar de cadmio



Variación de $i_p(\text{Zn-T})$ en función de la concentración molar de zinc



Variación de $i_p(\text{Zn-T})$ en función de la concentración molar de cadmio+zinc

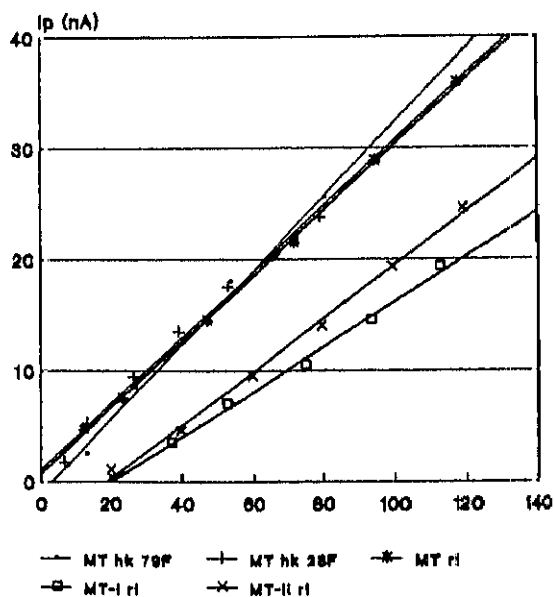
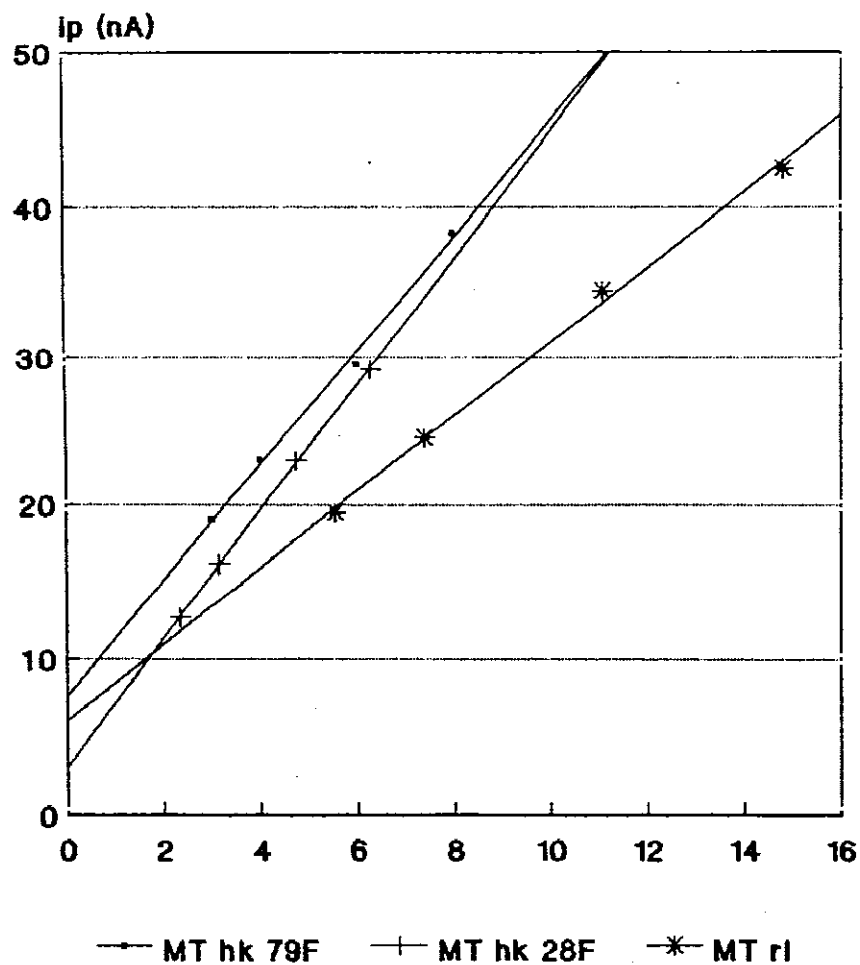
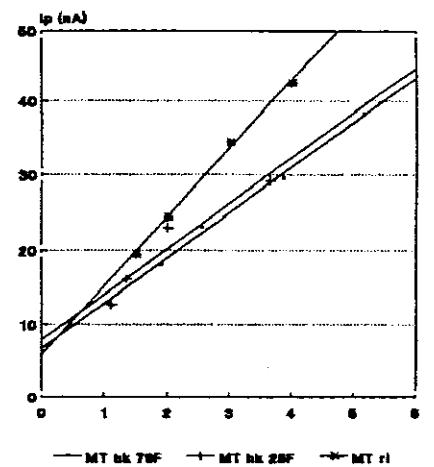


Fig. 127. Intensidad del tercer pico en función de la concentración.

$i_p(1)$ en función de la concentración de cadmio para las 3 MT (I+II)



$i_p(1)$ en función de la concentración de zinc para las 3 MT (I+II)



$i_p(1)$ en función de la concentración de cadmio+zinc para las 3 MT (I+II)

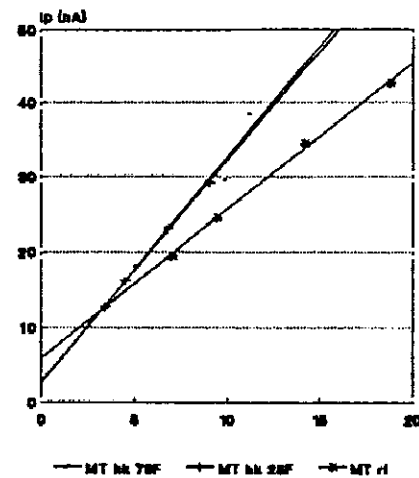


Fig. 128. Intensidad del primer pico en función de la concentración, para pH=2.0.

Para cada representación las pendientes son próximas entre ellas. Tal y como se puede observar en las figuras 124-125 la señal del primer pico depende del contenido total de cationes presentes en la MT. A mayor contenido metálico se produce mayor señal. Cuando se representa $ip_{1MT}=f(Cd+Zn)$ se obtiene una recta única para las cinco MT, sin embargo, cuando se representa $ip_{1MT}=f(Cd)$ o $ip_{1MT}=f(Zn)$ no se consiguen rectas únicas, sino que dependen de la naturaleza de la MT, ya que de ésta depende la relación entre metales. Por lo tanto, la intensidad de señal del primer pico depende de los grupos tióxicos que se encuentran asociados a cationes metálicos formando el complejo MT.

La señal del segundo pico, ip_{2MT} , que se atribuyó al cadmio asociado a la MT, nos sirve para determinar el contenido en este catión, ya que como se puede obtener de las gráficas 126 a, b y c sólo se obtiene una recta única, más o menos definida, cuando se representa $ip_{2MT}=f(Cd)$, lo que demuestra una relación directa entre ambas variables. De forma análoga, el ip_{3MT} sirve para determinar el contenido en el catión zinc que existe en las MT, ya que en este caso las pendientes son más próximas cuando se representa $ip_3=f(Zn)$, pero hay que indicar que las pendientes son menos similares que en el caso del cadmio ya que este pico se encuentra muy próximo al límite de electroactividad del electrolito y, por tanto, no está bien definido y se dificulta su medida.

Para poder comparar las pendientes obtenidas con el contenido metálico, se recogen en una tabla 28 los valores de la concentración molar de metales por mol de metalotioneína para cada uno de los metales (tabla 28).

Tabla 28. Valores de concentración molar de cada uno de los cationes por mol de tioneína para las cinco MT comercializadas.

MUESTRA	mol Cd/mol MT	mol Zn/mol MT	molCd+Zn/mol MT
MT h.k. lot.79F9670	2.67	1.87	4.54
MT h.k. lot.28F9545	2.20	0.70	2.90
MT r.l. lot.20H9650	5.20	1.33	6.53
MT-I h.k. lot.129F9575	4.07	1.07	5.14
MT-II h.k. lot.79F9510	4.07	1.00	5.07

Por otro lado se recogen en tres tablas, 29-31, el valor de la pendiente de cada uno de los picos para las cinco MT en función del contenido de muestra existente de ellas, expresado en función del contenido metálico o del producto total, además en el caso del primer pico se expresa en función de tres veces el contenido metálico para indicar el número de grupos tiólicos asociados a cationes existentes en dicha metalotioneína.

Tabla 29. Pendientes correspondientes a la intensidad de señal del primer pico en función de cada uno de los valores de concentración estudiados para las cinco metalotioneinas comercializadas

MUESTRA	$ip_1=f(C_{P_1})$	$ip_1=f(C_{Cd})$	$ip_1=f(C_{Zn})$	$ip_1=f(C_{P_2})$	$ip_1=f(C_{P_3})$
MT h.k. 79F9670	16.4	6.31	9.90	3.85	1.26
MT h.k. 28F9545	12.3	6.03	13.8	4.20	1.40
MT r.l. 20H9650	28.8	5.99	21.9	4.70	1.57
MT-I r1 129F9545	20.6	5.46	18.8	4.23	1.44
MT-II r1 79F9510	18.6	4.47	18.7	3.61	1.20

* Todas las pendientes están expresadas como: $10^6(\text{nA-M}^{-1})$

Tabla 30. Pendientes correspondientes a la intensidad de señal del segundo pico en función de cada uno de los valores de concentración estudiados para las cinco metalotioneinas comercializadas

MUESTRA	$ip_2=f(C_{P_1})$	$ip_2=f(C_{Cd})$	$ip_2=f(C_{Zn})$	$ip_2=f(C_{P_2})$
MT h.k. 79F9670	16.5	6.32	9.90	3.85
MT h.k. 28F9545	13.2	6.50	14.9	4.52
MT r.l. 20H9650	34.5	7.18	26.2	5.63
MT-I r1 129F9545	21.6	5.67	19.6	4.40
MT-II r1 79F9510	22.1	5.31	22.2	4.28

* Todas las pendientes están expresadas como: $10^6(\text{nA-M}^{-1})$

Tabla 31. Pendientes correspondientes a la intensidad de señal del tercer pico en función de cada uno de los valores de concentración estudiados para las cinco metalotioneínas comercializadas

MUESTRA	$ip_3=f(C_{Pb})$	$ip_3=f(C_{Cd})$	$ip_3=f(C_{Zn})$	$ip_3=f(C_T)$
MT h.k. 79F9670	14.2	5.46	8.50	3.33
MT h.k. 28F9545	8.70	4.27	9.80	2.97
MT r.l. 20H9650	18.1	3.76	13.7	2.95
MT-I rl 129F9545	10.1	2.60	9.20	2.03
MT-II rl 79F9510	12.5	2.99	12.5	2.42

* Todas las pendientes están expresadas como: $10^6(\text{nA-M}^{-1})$

A partir de los datos de las tablas se puede observar que para el primer pico los valores de las pendientes son muy próximos para las cinco metalotioneínas cuando se calculan en función del contenido total de producto o del contenido total de cationes metálicos presentes en la muestra. De tal manera, que para las representaciones $ip_{1MT}=f(\text{Cd}+\text{Zn})$ de las cinco MT se obtiene una recta única. Esta representación nos permite obtener un método de valoración del contenido total de MT de una muestra dada, independientemente del origen de la misma.

Para el segundo pico, atribuido al complejo Cd-T, las pendientes más próximas entre las cinco MT se obtienen cuando se representa la señal del segundo pico en función del contenido de cadmio, como se observa en la figura 126. Aunque no se llega a obtener una recta única, los valores de la pendiente son mayores cuanto mayor lo es el contenido de cadmio presente en la MT para las muestras procedentes del mismo origen, pero no cuando la procedencia es diferente.

El tercer pico, atribuido al complejo Zn-T, presenta un comportamiento análogo (fig. 127), es decir la señal de éste en función del contenido en zinc es la que presenta las pendientes más próximas para las cinco MT, sin embargo, contrariamente al caso del cadmio es difícil de trazar una recta única, ya que los picos están menos definidos, por lo tanto, no se pueden sacar datos que nos permitan obtener conclusiones claras.

Se realizó otro estudio paralelo de la intensidad de señal del primer pico en función del contenido total de MT o del contenido metálico para las tres MT mezcla de isoformas en medio ácido, TRIS·HCl pH 2.0. Los valores de las pendientes se indican en la siguiente tabla 32.

Tabla 32. Pendientes correspondientes a la intensidad de señal del primer pico a pH 2.0 en función de cada uno de los valores de concentración estudiados para las tres metalotioneinas comercializadas que son mezcla de ambas isoformas.

MUESTRA	$ip_1=f(C_T)$	$ip_1=f(C_{Cd})$	$ip_1=f(C_{Zn})$	$ip_1=f(C_M)$
MT h.k. 79F9670	84.4	4.35	5.30	2.44
MT h.k. 28F9545	84.4	4.55	22.0	2.67
MT r.l. 20H9650	123.4	2.47	18.8	1.82

* Todas las pendientes están expresadas como: $10^6(\text{nA-M}^{-1})$

Al representar la intensidad de señal en función de la concentración (fig. 128), se puede observar que la señal depende del contenido total de la muestra, la pendiente $ip_1=f(C_M)$ depende de forma directa con el contenido total de muestra, pero la pendiente, $ip_1=f(C_M)$, está en relación inversa al contenido total de metales.

A partir de los resultados expuestos, proponemos como método de valoración de las metalotioneínas, la medida de la intensidad del primer pico, de cuya señal es responsable la parte orgánica de esta proteína. Además proponemos, también como método de cuantificación del contenido de cadmio a la medida de la intensidad de señal del segundo pico del perfil polarográfico de la metalotioneína, al que se ha denominado $E_{p_{CdI}}$ y que se ha atribuido al complejo cadmio-tioneína. Estos dos métodos se proponen como tales ya que se ha obtenido una recta única en cada caso al representar $ip_{I_{NT}} = f(3 - C_{Cd+Zn})$ y $ip_{CdI} = f(C_{Cd})$. Al mismo tiempo indicamos que al representar $ip_{ZnI} = f(C_{Zn})$ se obtiene un conjunto de rectas en las que se emplea una de las rectas de calibrado correspondiente a una de las metalotioneínas para valorar otra metalotioneína diferente se comete un error mayor que en cualquiera de los dos casos precedentes.

Se calculan los características analíticas de los métodos propuestos y se indican en la tabla 33. En ella se indica la ecuación de la recta única para cualquier tipo de metalotioneína que se quiera valorar; el rango de linealidad estudiado, aunque se supone que para concentraciones superiores a 10^{-4} M no es lineal ya que, como hemos indicado a lo largo de este capítulo, el proceso que se produce en el electrodo sería diferente; el límite de detección y el coeficiente de variación.

Debemos indicar que cuando se valora una de las metalotioneínas en la recta de la otra el error que se comete, expresado en tanto por ciento, está comprendido en el siguiente intervalo: 1.7 - 29 %. Por lo tanto, se puede considerar este método como apropiado para la valoración del contenido en metalotioneínas de una muestra problema. Siendo menor el error cometido cuanto menor sea la concentración de la muestra.

Tabla 33. Características analíticas de las funciones $i_p=f(C)$ propuestas como métodos de valoración de las metalotioneínas y su contenido metálico

F U N C I O N	CARACTERISTICAS ANALITICAS:
$i_{p_{INT}}=f(3C_{Cd+Zn})$	<p>Ecuación de la recta: $y = -0.405 + 1.4 \cdot 10^6$</p> <p>Intervalo de linealidad: $2.0 \cdot 10^{-6} - 3.57 \cdot 10^{-5} \text{ M}$</p> <p>Límite de detección: $9.62 \cdot 10^{-7} \text{ M}$</p> <p>Coefficiente de variación: 13.79</p>
$i_{p_{CdI}}=f(C_{Cd})$	<p>Ecuación de la recta: $y = -1.015 + 6.07 \cdot 10^6$</p> <p>Intervalo de linealidad: $4.5 \cdot 10^{-7} - 9.6 \cdot 10^{-6} \text{ M}$</p> <p>Límite de detección: $2.63 \cdot 10^{-7} \text{ M}$</p> <p>Coefficiente de variación: 16.22</p>
$i_{p_{ZnI}}=f(C_{Zn})$	<p>Ecuación de la recta: $y = 0.0177 + 9.57 \cdot 10^6$</p> <p>Intervalo de linealidad: $2.5 \cdot 10^{-7} - 3.15 \cdot 10^{-6} \text{ M}$</p> <p>Límite de detección: $9.62 \cdot 10^{-6} \text{ M}$</p> <p>Coefficiente de variación: 26.40</p>

Para terminar el apartado dedicado al estudio polarográfico de las metalotioneínas hemos de recalcar los siguientes puntos:

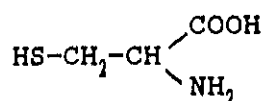
1) Se obtienen polarogramas análogos para las distintas metalotioneínas, independientemente de su origen, que presentan simultaneamente tres picos perfectamente definidos que, de potenciales positivos a negativos, se han atribuido a la oxidación del mercurio del electrodo en presencia de los grupos tiólicos de la parte orgánica de la molécula, al complejo cadmio-tioneína y al complejo zinc-tioneína, respectivamente.

2) Es un método cualitativo que nos permite identificar las diferentes especies químicas que existen en la disolución: cationes libres, los complejos Cd-T, Zn-T o Cd-T' y la tioneína.

3) La polarografía se puede emplear como método de valoración de las metalotioneínas y de su contenido metálico, tal y como acabamos de indicar.

V.C.2. CISTEINA

Con el objeto de comparar el comportamiento electroquímico de las MT, como se ha hecho precedentemente por el método espectrofotométrico, se ha realizado un breve estudio sobre la respuesta polarográfica de la cisteína. Este compuesto es un aminoácido que se encuentra presente en elevada proporción, 33%, en las MT y parece que juega un papel fundamental en la complejación de los cationes metálicos, función principal y fundamental de estas proteínas. La cisteína tiene la fórmula siguiente:



CISTEINA

Este aminoácido presenta tres grupos funcionales, los dos típicos de cualquier aminoácido, el grupo carboxílico y el amino y, otro en el extremo terminal de la cadena, el tiólico. Presentará, por lo tanto, propiedades ácido-base que originan un comportamiento de la cisteína diferente en función del pH.

Tanto las constantes ácido-base, como las constantes de complejación con cadmio y zinc han sido determinadas por métodos espectrofotométricos y electroquímicos (310) siendo 9.89 el valor para el complejo Cd-Cys y 17.1-18.2 para los de Zn-Cys.

V.C.2.A. COMPORTAMIENTO A DIFERENTES pH

Se ha estudiado el comportamiento de la cisteína en función de dos pH diferentes, neutro y ácido.

Los polarogramas se presentan en la figura 129. En ella se observa claramente la influencia del pH, ya que a pH 7.5 presenta un pico a un potencial -0.430 V (v.s. Ag/AgCl).

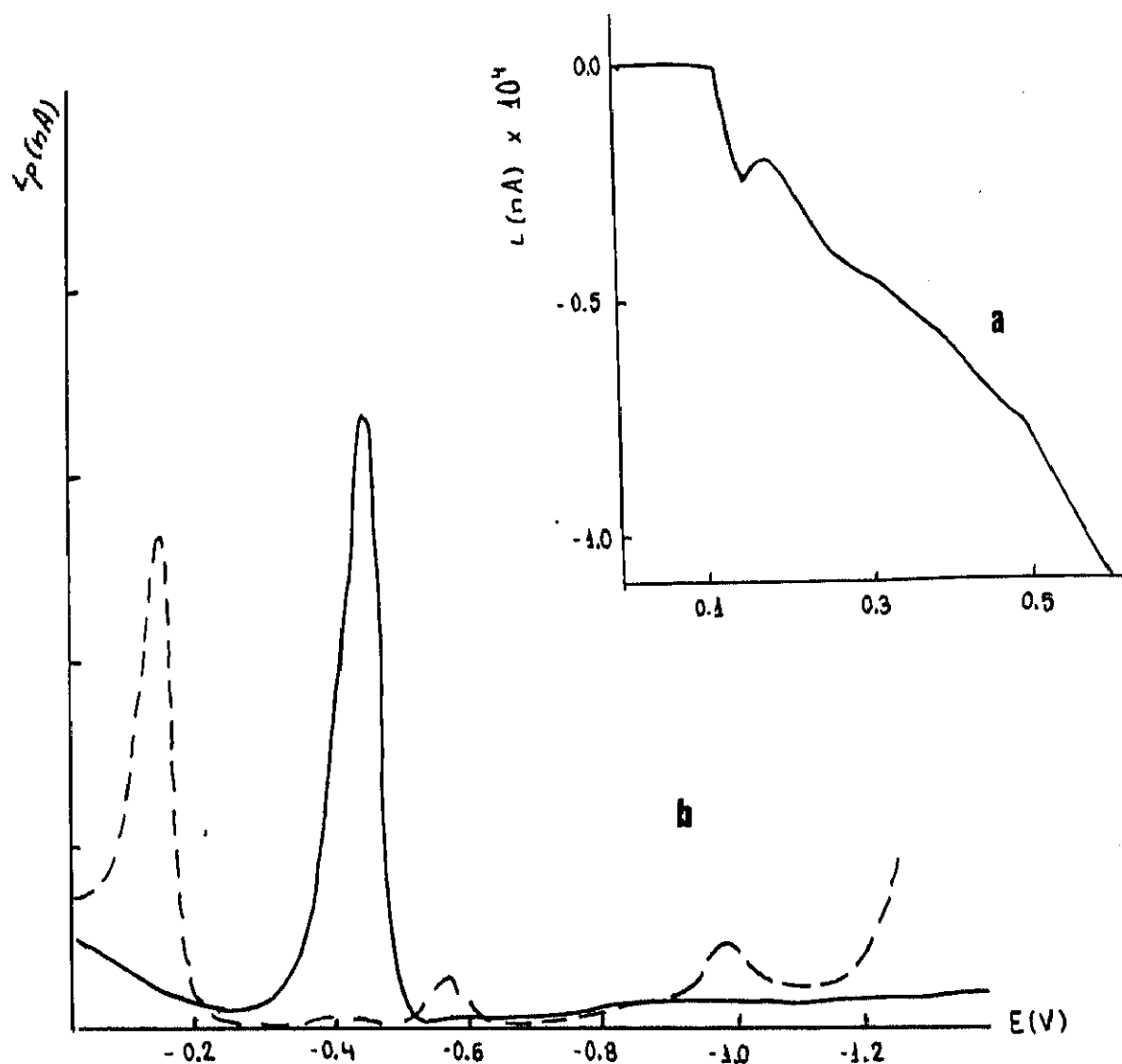


Fig. 129. (a) D.E.A. del TRIS HCl 2.5×10^{-2} M en el limite correspondiente a la oxidación del mercurio.
 (b) D.P.P. de una disolución 4.12×10^{-6} M de cisteína en el mismo medio a pHs diferentes: (—) 7.5 y (---) 2.0.

A pH ácidos, pH=2.0, este pico se desplaza hacia potenciales menos negativos, -0.138V.

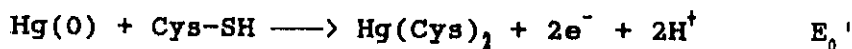
A partir del polarograma de oxidación del mercurio correspondiente al dominio de electroactividad del disolvente, D.E.A., en oxidación limitado por el comportamiento electroquímico del propio electrodo y, del polarograma de la cisteína a pH=7.5 se puede comprobar y comentar el mecanismo propuesto precedentemente.

A la concentración que se realiza este estudio $4 \cdot 10^{-6}$ M los fenómenos de adsorción en el electrodo son poco probables.

La oxidación del mercurio en un medio dado, TRIS HCl (fig. 129 a) es:



en presencia de cisteína:



$$E_0' = E_0 - 0.029 \log K'(\text{CysHg})$$

La constante de estabilidad aparente a este pH y en este medio no ha sido determinada. El valor de la constante de estabilidad que se encuentra en la literatura $\log K = 20.5$ nos permite, de manera aproximada evaluar E_0' :

$$E_0' = 0.1\text{V} - 0.029 \cdot 20.5 = -0.495 \text{ V}$$

Este valor teórico, -0.495 V, es próximo del valor experimental obtenido, -0.430 V, en particular si se tiene en cuenta que a pH=7.5, pH utilizado en nuestro experimento la constante aparente debe ser menor que el dado en la literatura puesto que a ese pH la cisteína no se encuentra completamente en forma de anión ($\text{pK}_a \approx 9.0$) en medio fosfato.

La intensidad de los dos picos para una misma concentración en mol/L a los dos pH estudiados es:

$$\frac{i_p(\text{pH } 2.0)}{i_p(\text{pH } 7.5)} = \frac{273.8}{336.3} = 0.8$$

La relación de señal polarográfica a ambos pH es parecida a la que se ha encontrado para la MT, 0.5 aproximadamente. Es probable que suceda el mismo tipo de fenómeno, aunque, en este caso no haya cationes metálicos ligados a los grupos tiolatos.

En el caso de la cisteína, molécula de composición conocida y con una estructura definida la diferencia entre la altura de pico a pH=2.0 y a pH=7.5 se puede explicar difícilmente por fenómenos estructurales o modificaciones en el acceso a la superficie del electrodo. En este caso la diferencia de la señal puede ser debida al propio proceso electroquímico. Como ya se ha señalado, hay una ambigüedad en el grado de oxidación del mercurio que interviene en el proceso de oxidación. Parece probable, por lo tanto, que para pH neutros o básicos el mercurio se oxide prioritariamente a Hg(II).

V.C.2.B. ADICIONES PATRON DE CISTEINA A LA MT

Se ha realizado un ensayo puntual a los dos pH seleccionados en el que se comparan los polarogramas de la MT, sola y tras la adición de cierta cantidad de cisteína del mismo orden de magnitud que la concentración de MT en disolución y, así, poder comprobar si los picos se superponen.

Los polarogramas de la MT a los pH estudiados se observan en las figuras 130 a y 131 a. Cuando se realiza la adición de cisteína a la disolución se observa que el potencial del primer pico aparece al potencial de la cisteína a cada uno de los dos

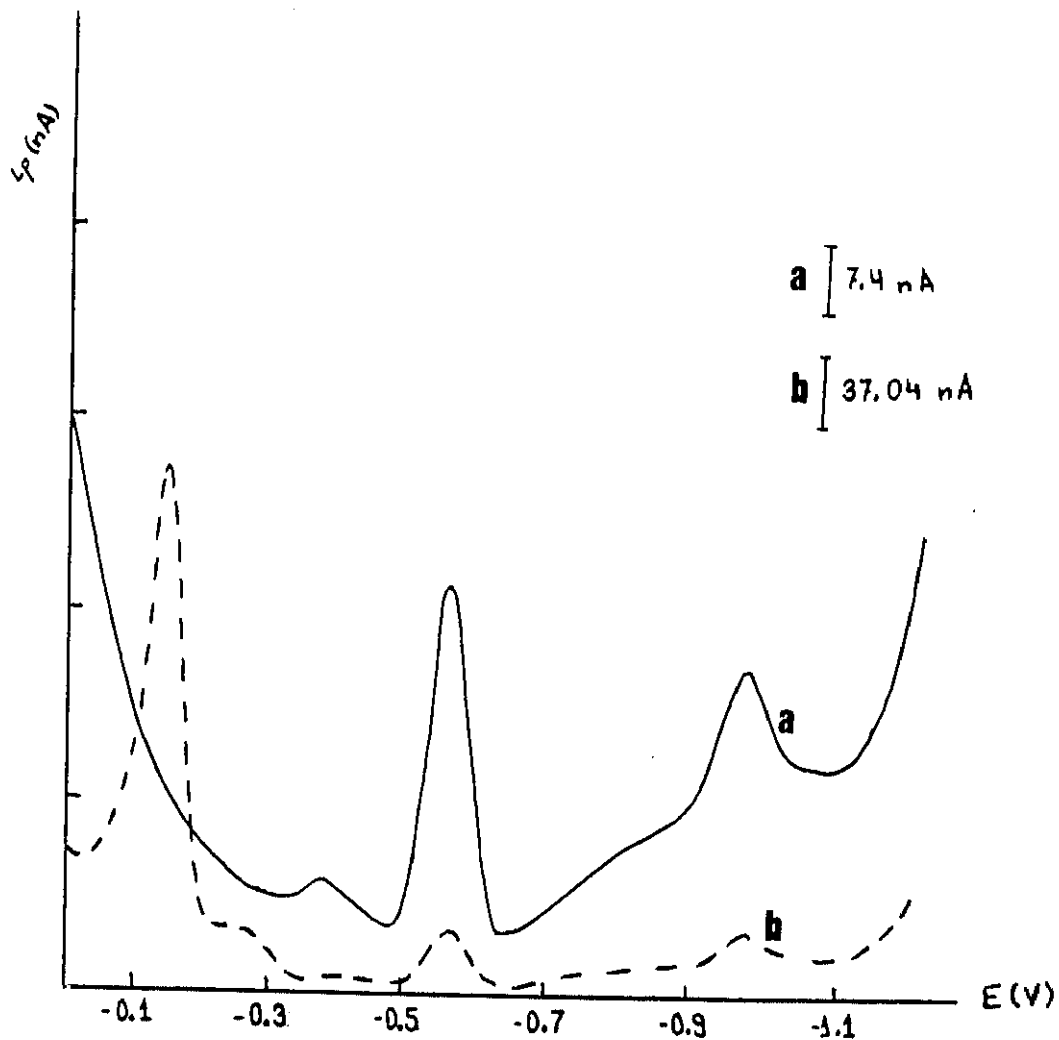


Fig. 130. D.P.P. de una disolución $7.69 \cdot 10^{-7}$ M de MT (a) sin y (b) tras la adición de $2.06 \cdot 10^{-5}$ M de cisteína en el mismo medio TRIS HCl $2.5 \cdot 10^{-2}$ M pH 2.0.

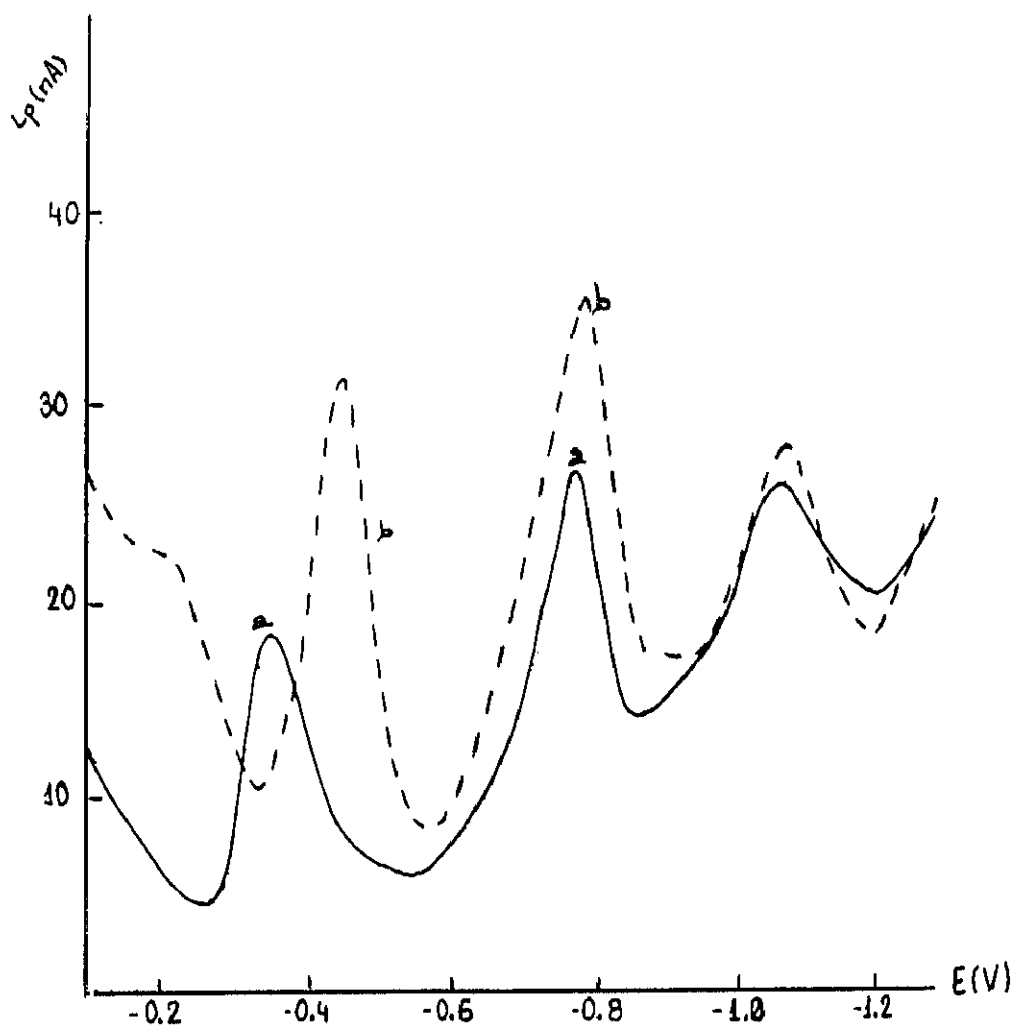


Fig. 131. D.P.P. de una disolución $7.69 \cdot 10^{-7}$ M de MT (a) sin y (b) tras la adición de $2.06 \cdot 10^{-3}$ M de cisteína en el mismo medio TRIS HCl $2.5 \cdot 10^{-2}$ M pH 7.5.

pH (fig. 130 b y 131 b), es decir, que existe un único pico de oxidación en presencia de los dos compuestos.

Por otra parte en las figuras 130 b y 131 b se observa un aumento de la señal, atribuida al primer pico, con relación a la señal debida a cada uno de los dos compuestos por separado. A pH=7.5 en que la adición de cisteína, es del mismo orden de magnitud que la MT se observa que la intensidad del nuevo pico, que coincide con el potencial de la cisteína es aproximadamente igual a la suma de las intensidades de pico de ambos compuestos:

$$ip_1 (\text{cys}+\text{MT}) = 22.2 \text{ nA}$$

$$ip_1 (\text{cys}) = 12.3 \text{ nA}$$

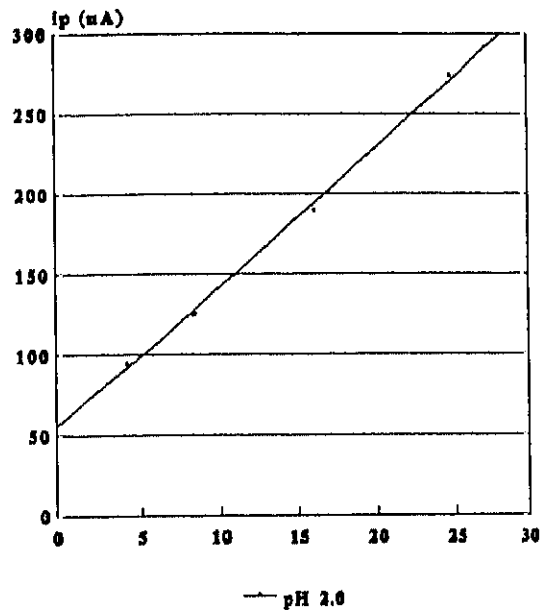
$$ip_1 (\text{MT}) = 13.3 \text{ nA}$$

Esta experiencia confirma la hipótesis de la atribución del primer pico de la MT a la complejación por los grupos tiólicos asociados a la cisteína en la cadena aminoacídica. Es probable que la cadena lateral asociada al grupo tiólico influya considerablemente en la posición de este pico esa cadena es muy diferente en la cisteína y en la MT, con un peso molecular unas sesenta veces superior. Este ensayo se puede considerar como indicativo de que el grupo tiólico, común en ambas moléculas se encuentre afectado por la naturaleza de la cadena peptídica a la que está asociado, lo que origina que exista una diferencia de potencial entre los dos picos correspondientes a la oxidación del mercurio en presencia de las dos sustancias.

V.C.2.C. ESTUDIO EN FUNCION DE LA CONCENTRACION

En el estudio de la intensidad de pico en función de la concentración se obtiene las curvas de la figura 132, en ellas se observa que existe una relación lineal entre la intensidad y la concentración, tanto a pH neutros, como ácidos y cuyas pendientes se indican en la tabla 34.

**Intensidad de pico en función
la concentración de cisteína**



**Intensidad de pico en función de la
concentración de cisteína**

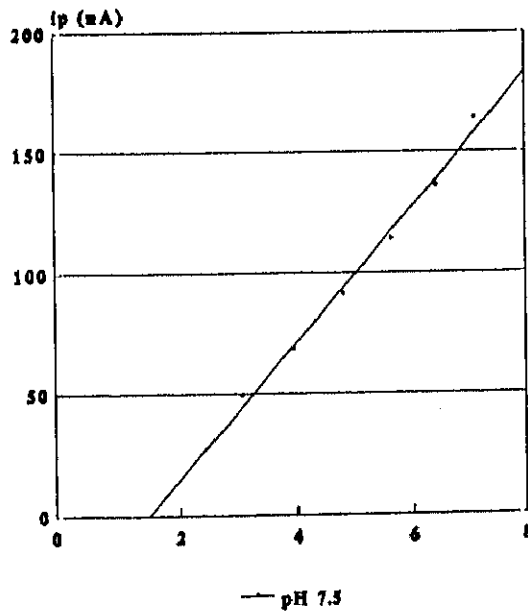


Fig. 132. Intensidad de señal en función de la concentración de cisteína disuelta en TRIS HCl $2.5 \cdot 10^{-4}$ M a pHs 7.5 y 2.0.

El hecho de que se encuentre una variación lineal $i_p = f(c)$ en esa gama de concentraciones que llegan a $7.1 \cdot 10^{-4}$ parece confirmar que los fenómenos de adsorción en un electrodo de gotas de mercurio que se renueva constantemente no son los preponderantes en el proceso electroquímico.

Tabla 34. Potencial y pendiente de la recta $i_p = f(c)$ para la cisteína en TRIS a dos pH diferentes.

pH	$E_{p_{cys}} (V)$	b (mA/mol)
7.5	-0.430	$2.76 \cdot 10^5$
2.0	-0.130	$8.70 \cdot 10^6$

V.C.3. FRAGMENTO TERMINAL 56-61 DE LA MT-I

El fragmento terminal 56-61 de la MT-I formado por los siguientes aminoácidos Lys-Cys-Thr-Cys-Cys-Ala presenta tres unidades de cisteína que es la unidad fundamental para la complejación de los cationes divalentes (344). Por este motivo hemos considerado de interés realizar unos ensayos, si bien no tan exhaustivos como en la MT y, así, comparar el comportamiento polarográfico de ambos compuestos. Existen varias diferencias entre ambas moléculas que pueden ser de interés:

- el fragmento no está asociado a metales
- la estructura es mucho mas sencilla que en la MT.

El hecho de que el fragmento 56-61 no contenga metales asociados a la molécula presenta una gran ventaja para nuestro trabajo, ya que no se ha podido obtener la apotioneína, es decir, la MT sin cationes metálicos, de gran utilidad para caracterizar el primer pico de la MT. Así mismo, la estructura sencilla y conocida de esta molécula puede servir para sacar conclusiones más fácilmente que en el caso de la MT cuya estructura y peso molecular no son conocidos.

La estructura del fragmento permite el enlace con cationes metálicos, en estos enlaces pueden intervenir los grupos tiólicos de las cisteínas y el grupo amino de la lisina.

V.C.3.A. COMPORTAMIENTO EN FUNCION DEL pH

El fragmento terminal 56-61 de la MT-I de hígado de ratón debido a su composición presenta propiedades ácido-base, que hacen que su comportamiento electroquímico varíe en función del pH. Se han realizado, por lo tanto, polarogramas a diferentes pHs que varían entre 1.9 y 8.94.

Los polarogramas obtenidos de la respuesta del fragmento en función del pH se muestran en la figura 133, en la que se observa

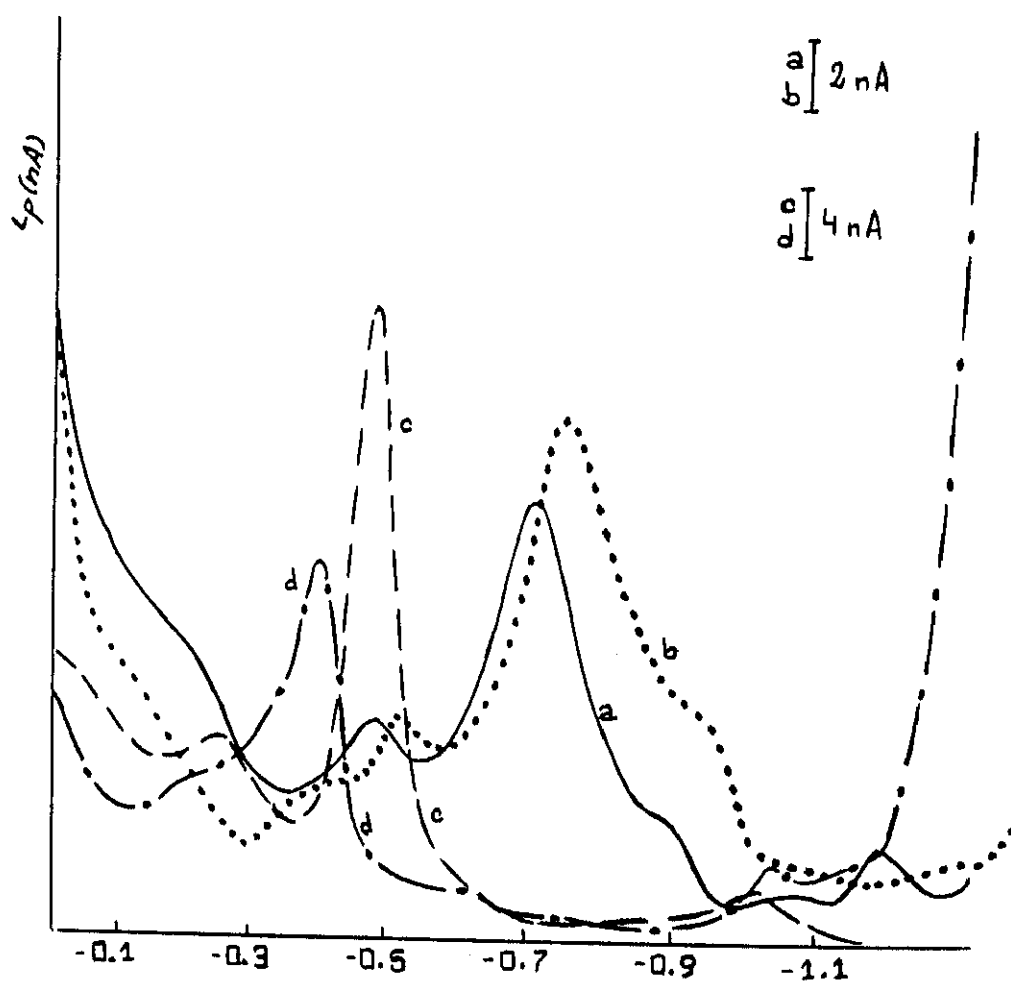


Fig. 133. D.P.P. de una disolución $1.56 \cdot 10^{-5}$ M del Fragmento terminal 56-61 TRIS HCl $2.5 \cdot 10^{-2}$ M a diferentes pHs: (a) 7.5, (b) 8.94, (c) 3.71 y (d) 1.9.

un claro desplazamiento del potencial al cual aparece el pico en función del pH, el desplazamiento tiene lugar hacia potenciales más positivos a medida que el pH disminuye.

Cuando se representan el potencial de pico del fragmento y la intensidad del mismo en función del pH (fig. 134) se observa que la variación $E_p=f(pH)$ es lineal en todo el intervalo de pH estudiados. Como se ha comprobado por espectrofotometría, en ese intervalo de pH, el fragmento se encuentra protonado. Para obtener una variación análoga a la obtenida para la metalotioneína y poder determinar el pK_a de este compuesto es necesario aumentar el rango de pHs estudiado hacia pH más básicos.

Por el contrario, la intensidad de pico varía de forma aleatoria en función del potencial en que aparece $E_p(F)$. Sin embargo, su respuesta es mayor a pH ácidos que a pH básicos, contrariamente a lo que sucedía con la cisteína y la MT.

Aparentemente, el pH de la disolución tiene una influencia grande sobre la cinética del proceso electroquímico. En efecto, cuanto más rápido es un proceso los picos son más cinéticos y la anchura a la semialtura, $w_{1/2}$, es más pequeña. En la tabla 35 se da este último parámetro en función del pH.

Tabla 35. Valores de $w_{1/2}$ a diferentes pHs.

pH	$w_{1/2}$ (cm)
8.94	1.70
7.50	1.40
3.71	0.65
1.90	1.00

Ep del fragmento en función del pH

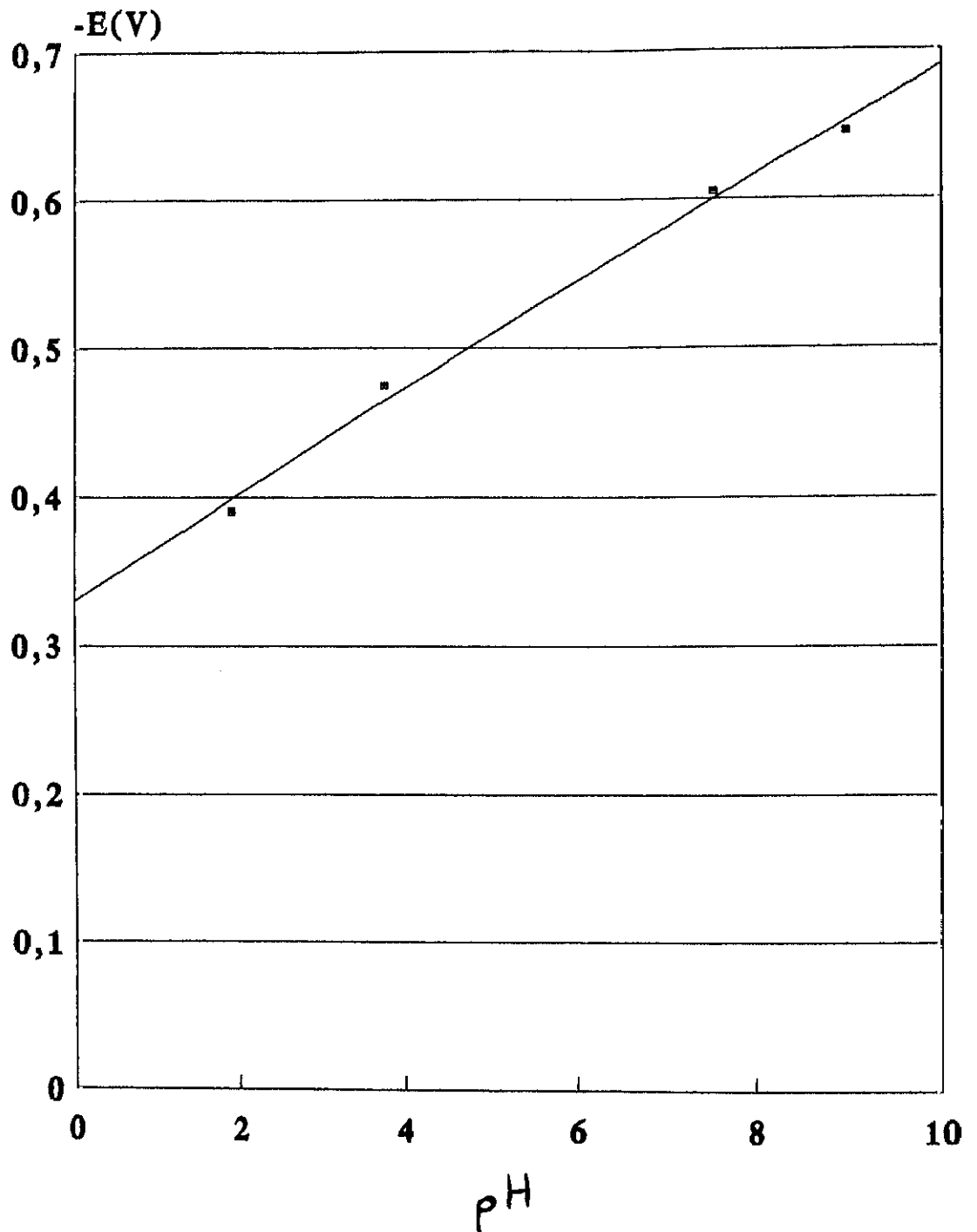


Fig. 134. Representación del potencial del fragmento en función del pH de la disolución.

Si se comparan los valores indicados en la tabla se observa como el valor de la anchura a la semialtura del pico es menor para pHs ácidos que para pHs básicos, por lo tanto, el proceso en el electrodo es más rápido a pHs ácidos.

El potencial de semionda viene dado por la siguiente ecuación (a):

$$E_k = E_{cte} - \frac{2.3mRT}{nF} \text{ pH} = E_{cte} + \frac{0.058 m}{n} \text{ pH} \quad (a)$$

Si se compara la pendiente experimental obtenida, 0.052V/pH, con la teórica dada por la ecuación (a), el fragmento interviene con un mecanismo en el que el número de protones, m, es igual al número de electrones, n, del proceso electroquímico. Por otra parte, el potencial al que aparece el pico del fragmento, a pH 7.5, es análogo al que han obtenido otros autores (334) para compuestos de diferentes estructuras con grupos tiólicos en la molécula.

Si se comparan los polarogramas obtenidos del fragmento (F) y de la metalotioneína (MT) en las mismas condiciones se observa que los picos polarográficos no coinciden para un pH 7.5 (figuras 135 a y b), lo que cabía esperar ya que, aunque los grupos funcionales que intervienen en ambas moléculas son los mismos, su estructura difiere considerablemente. Sin embargo, se ve que el pico del fragmento a pH 2.0 (fig. 136 a), coincide perfectamente con el primer pico de la MT a pH 7.5 (fig. 136 b), lo que confirma, de nuevo, la hipótesis de que ese pico es debido a una reacción electroquímica en la que pueden intervenir los grupos tiólicos enlazados, bien a H^+ , bien a cationes metálicos. A pH=2.0 los cationes no se encuentran asociados a la tioneína por lo que se puede deducir que, a ese pH, la constante de estabilidad aparente del compuesto mercur-tiolato formado es análoga para el fragmento y para la apotioneína.

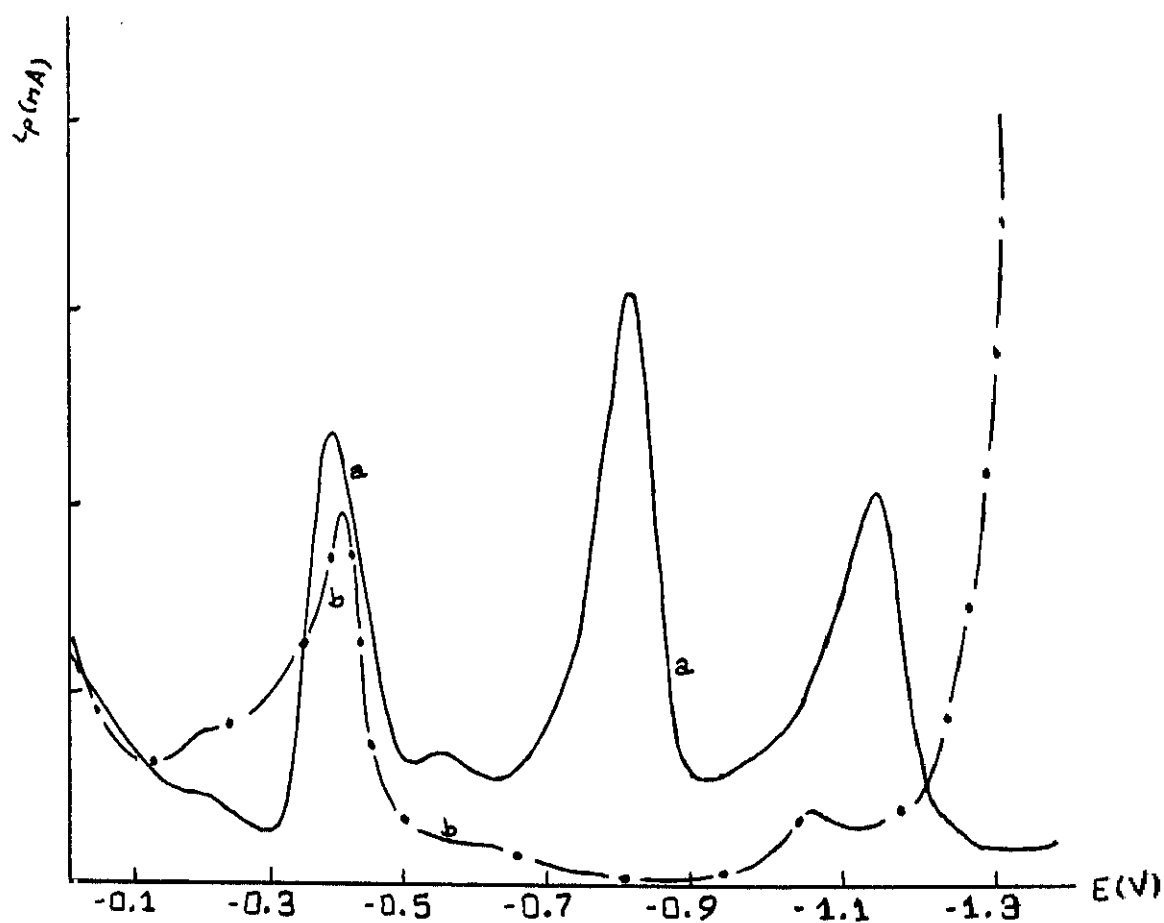


Fig. 135. D.P.P. de (a) una disolución de metalotioneína a pH 7.5 y (b) una disolución de fragmento a pH 1.9.

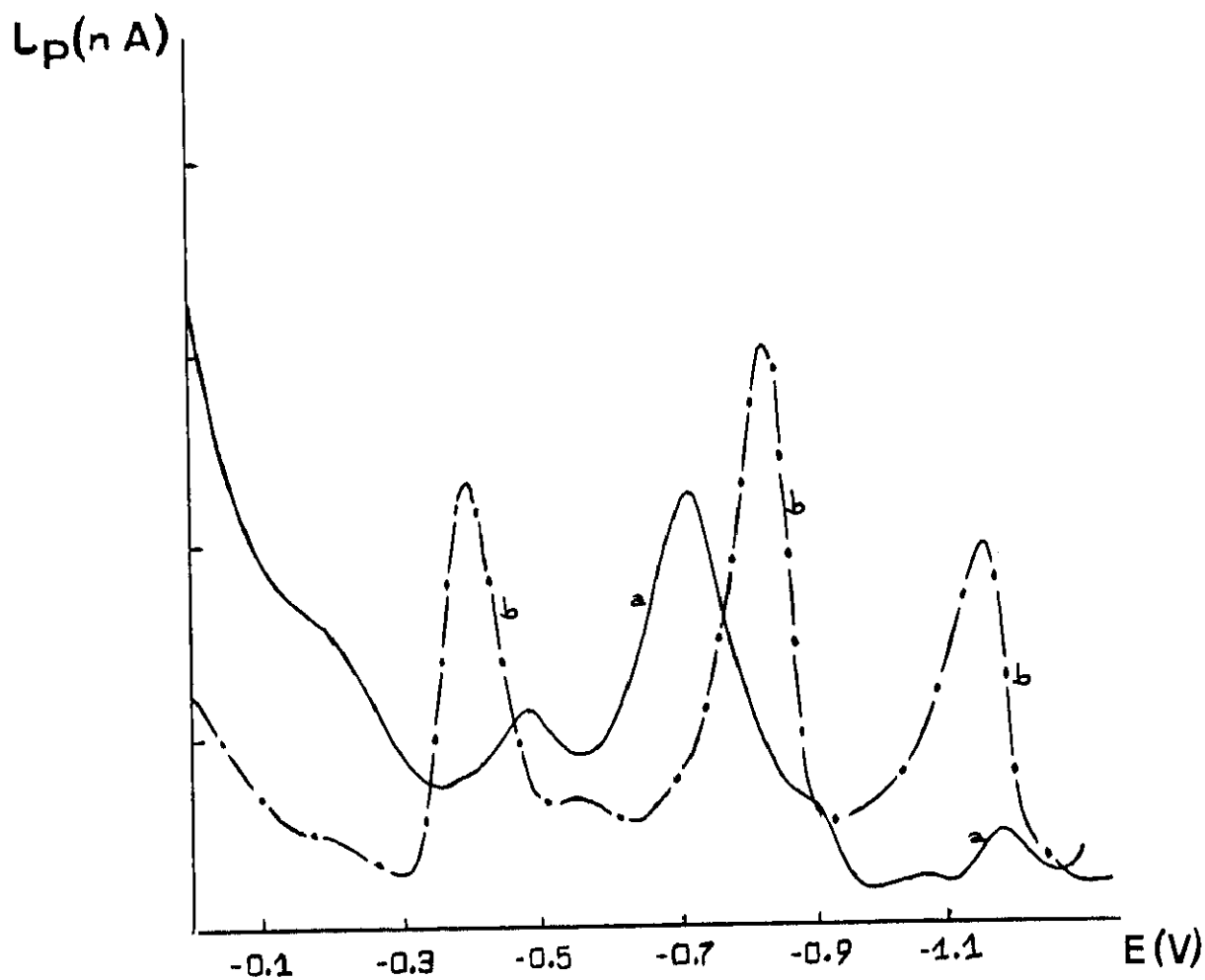
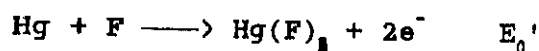


Fig. 136. D.P.P. de (a) una disolución de metalotioneína y (b) una disolución de fragmento ambos en TRIS HCl 2.5×10^{-4} M a pH 7.5.

Analogamente al caso de la cisteína, la oxidación del electrodo de mercurio se encuentra favorecida por la presencia de un agente complejante.



Probablemente, como se ha indicado, $m=2$. De la diferencia de potencial $E_0' - E_0$ [$\text{Hg(II)}/\text{Hg(0)}$] se puede deducir la constante de estabilidad aparente para el complejo mercurio-fragmento, Hg-F . Así, a $\text{pH}=8.94$, $E_0' = -0.750 \text{ V}$ (fig. 133 a) y $E_0 = 0.1 \text{ V}$ por lo tanto, a partir de la ecuación:

$$E_0' - E_0 = 0.029 - \log K'(\text{HgF})$$

podemos deducir el valor de la constante, $\log K'(\text{HgF}) = 28.3$ ($\text{pH}=8.94$). Esta constante de estabilidad no difiere sustancialmente de las constantes de estabilidad de complejos de mercurio con moléculas análogas.

V.C.3.B. COMPORTAMIENTO POLAROGRAFICO Y ESTABILIDAD DEL FRAGMENTO ASOCIADO A CATIONES CADMIO Y ZINC

En este apartado se describe el estudio realizado sobre el efecto de las adiciones, tanto de cadmio, CdCl_2 , como de zinc, ZnCl_2 , en una disolución de fragmento a un pH dado, por dos motivos. En primer lugar, para realizar un estudio análogo al que se hizo con las MT y, así, poder compararlas. En segundo, el fragmento carece de metales asociados, la adición de dichos cationes metálicos, Cd^{2+} y/o Zn^{2+} , la asemejarían a la MT de cadmio y/o zinc permitirá de nuevo su comparación.

a) Cadmio

Cuando se adiciona una disolución de iones cadmio al fragmento se obtiene el polarograma representado en la figura 137 b. Se observa que existen dos picos bien definidos a un potencial diferente del aquel al que aparecía el fragmento (fig. 137 a) y también diferente al cadmio libre en disolución. El potencial del primer pico en presencia de cadmio se denominará $F(Cd)$, lo que indica que se atribuye a la parte orgánica de la molécula en presencia de cadmio, coincide con el potencial del primer pico de la metalotioneína. Con respecto al segundo, que se atribuye a la reducción del cadmio complejoado con el fragmento y que se designará como CdF , por analogía con CdT , presenta un potencial más negativo que el de cadmio-tioneína, es decir la diferencia respecto al potencial del cadmio libre es mayor, lo que indica, de manera cualitativa que la constante de estabilidad aparente del complejo $Cd-F$ es mayor que la del complejo $Cd-T$.

b) Zinc

Un fenómeno análogo al descrito para el caso del cadmio, ocurre cuando se añade zinc a la disolución de fragmento. El pico a potencial más positivo (fig. 137 c) que se denominará, de manera similar al caso del cadmio, $F(Zn)$ aparece en la zona de potenciales del primer pico de la metalotioneína pero desplazado ligeramente a potenciales más negativos, lo que se comentará posteriormente. El otro pico que aparece a un potencial diferente al del zinc libre y que se atribuye a un complejo zinc-fragmento, $Zn-F$, coincide con el pico atribuido al del zinc-tioneína, $Zn-T$, en el caso de las metalotioneínas, lo que implica que las constantes de estabilidad de ambos compuestos son de la misma magnitud.

Por otra parte, cabe señalar que la morfología de los polarogramas cambia con respecto al inicial del fragmento (fig. 137 a). Se observa que los picos son agudos y bien definidos y,

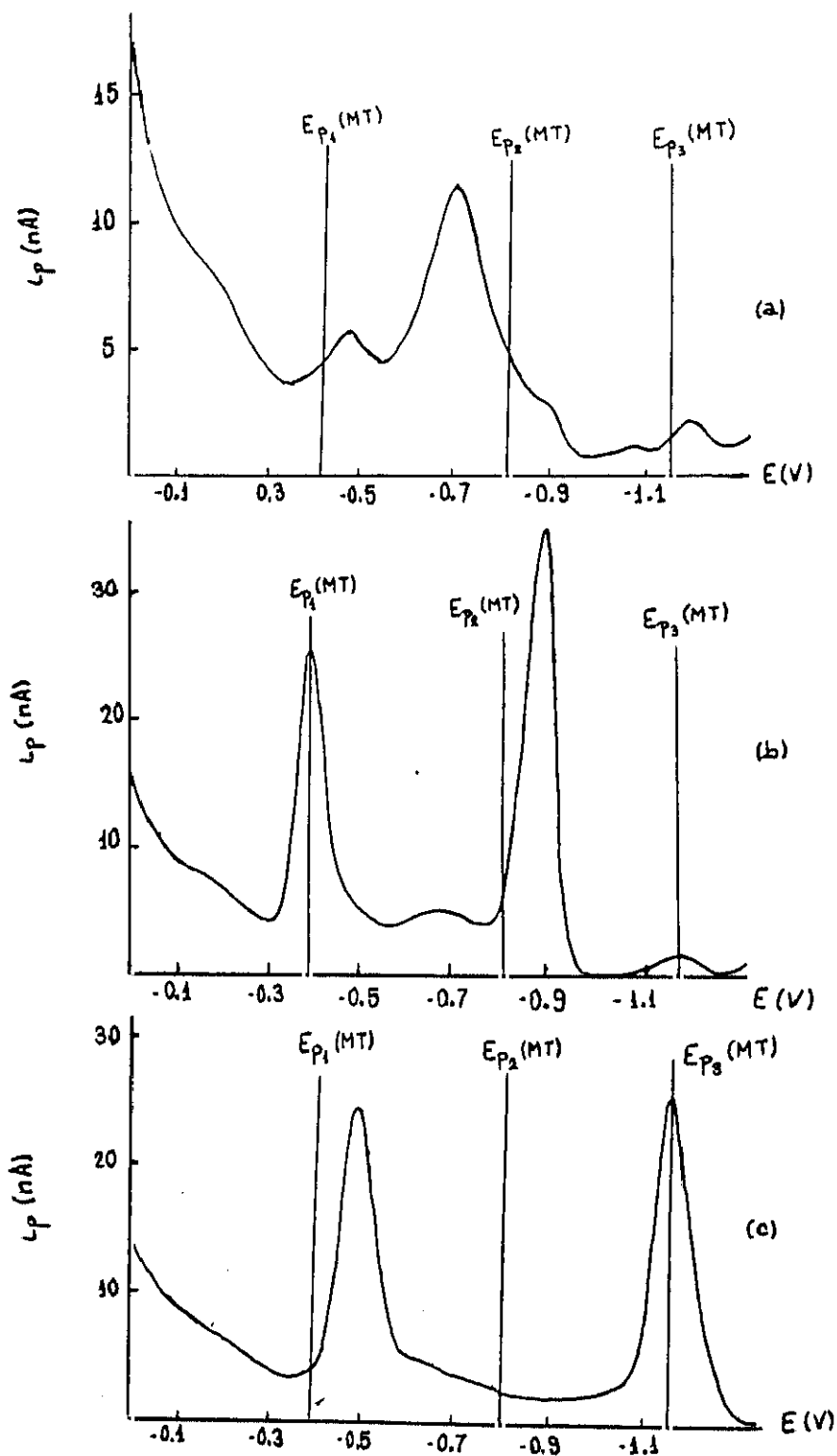


Fig. 137. D.P.P. de (a) una disolución de fragmento sólo, (b) fragmento más CdCl_2 , $7.8 \cdot 10^{-3}$ M, y (c) fragmento más ZnCl_2 , $7.8 \cdot 10^{-3}$ M, preparadas en TRIS HCl $2.5 \cdot 10^{-2}$ M a pH 7.5.

mucho más simétricos que el correspondiente al fragmento solo. En ambos casos se puede comparar la anchura a la semialtura del pico, para el fragmento solo y para los picos obtenidos en presencia de cationes metálicos. Los valores se agrupan en la tabla 36.

Tabla 36. Valores de $w_{1/2}$ a diferentes pHs para el pico correspondiente al fragmento solo o en presencia de cadmio o zinc.

Valor $w_{1/2}$	pH 7.5	pH 8.94	pH 3.71	pH 1.90
F(solo)	1.40	1.70	0.65	1.00
F(Cd)	0.65	0.70	0.70	1.00
F(Zn)	0.90	1.00	0.70	1.00

Se observa claramente que la anchura a la semialtura del pico varía de doble a simple para pHs neutros o básicos tras la adición de un catión metálico. A pHs muy ácidos en que la formación de complejo metal-fragmento no se produce no se observa variación de este parámetro aunque se adicionen cationes metálicos. Esta variación es más acusada en el caso del cadmio. Aparentemente la velocidad del proceso electroquímico es mayor en presencia de metales.

c) Cadmio + Zinc

Cuando a una disolución que contiene el fragmento se adicionan disoluciones de $ZnCl_2$ y $CdCl_2$ conjuntamente en exceso de concentración en relación al fragmento, el perfil polarográfico se modifica radicalmente (fig. 138 b). Se puede observar un claro desplazamiento del pico del fragmento que aparecía a -0.70 V cuando no existían metales (fig 138 a) hasta situarse a -0.37 V, potencial que coincide con el primer pico de

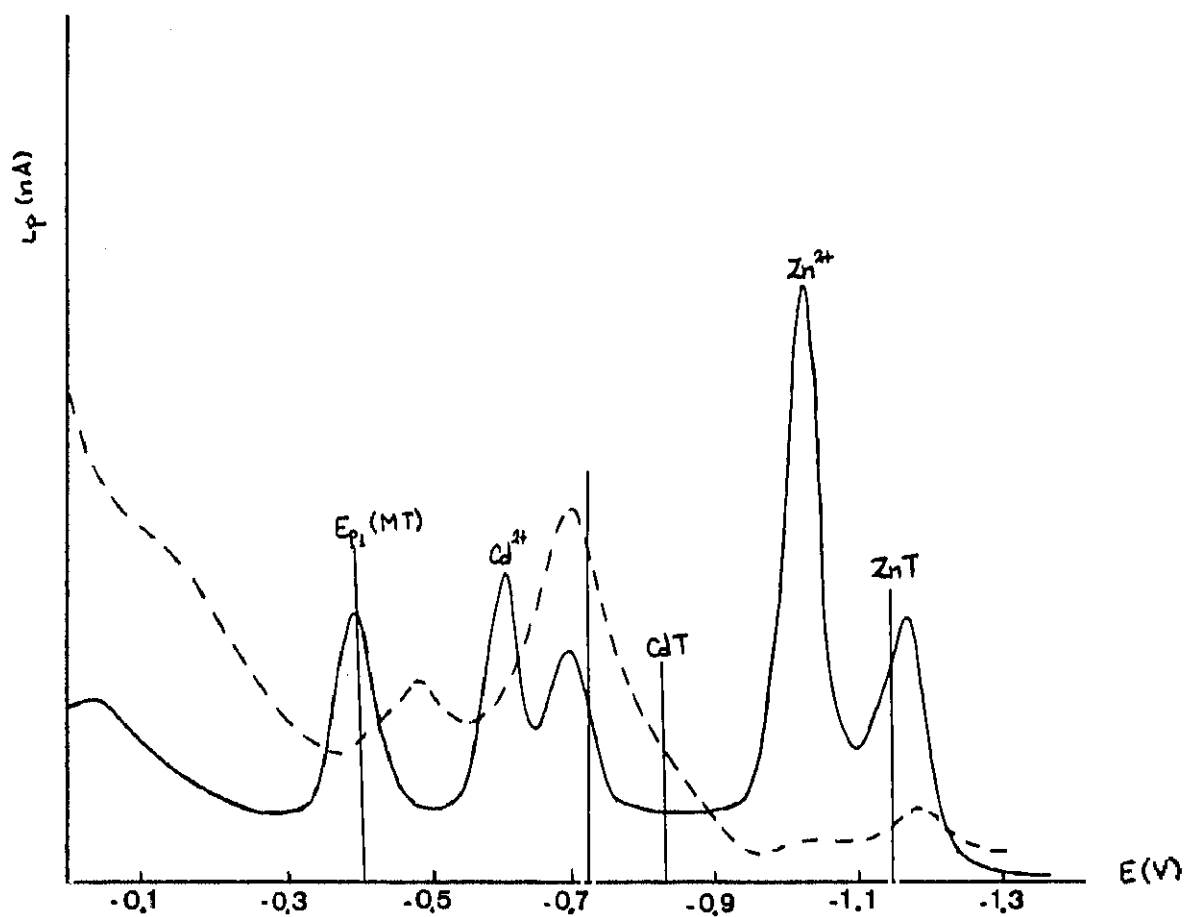


Fig. 138. D.P.P. de (a) una disolución de fragmento, $1.56 \cdot 10^{-5}$ M
 (b) fragmento + CdCl_2 , ($8.4 \cdot 10^{-5}$ M) + ZnCl_2 , ($1.16 \cdot 10^{-4}$ M)
 preparadas en TRIS HCl $2.5 \cdot 10^{-2}$ M a pH 7.5.

las MT y con el pico $ip_f(\text{Cd})$, lo que indica que el proceso electroquímico en ambos casos, MT y (Cd,Zn)-F es análogo. Aparecen además dos picos que de forma similar al caso de las MT que se han atribuido a complejos de Cd-T ($E \approx -0.7 \text{ V}$) y de Zn-T ($E \approx -1.15 \text{ V}$). En el polarograma pueden verse también los picos debidos al Cd^{2+} y Zn^{2+} libres y atribuidos al exceso de catión que no ha sido asociado por el fragmento. Parece interesante indicar que el pico que se ha atribuido al complejo del cadmio con el fragmento, en este caso en que existen ambos cationes, cadmio y zinc, presenta un potencial, $E_p = -0.70 \text{ V}$, diferente al obtenido precedentemente, por adición de cadmio a una disolución de fragmento, $E_p = -0.9 \text{ V}$ (fig. 137 b).

d) Polarogramas en función del tiempo

Se ha observado que el perfil polarográfico de la MT en presencia de mercurio varía con el tiempo. Se ha realizado un estudio similar con el fragmento asociado a los cationes cadmio y zinc.

Se puede comprobar en la figura 139 que el perfil polarográfico del fragmento en presencia de cadmio y zinc, en presencia de mercurio depositado en el fondo de la célula polarográfica y mantenido en la nevera durante cuatro días no varía prácticamente. De aquí se deduce que los complejos eventuales que forma el fragmento con cadmio y zinc son mucho menos lábil que las (Cd,Zn)-T. Esto podría explicarse debido a que el fragmento es una molécula mucho mas pequeña y, por tanto, menos alterable.

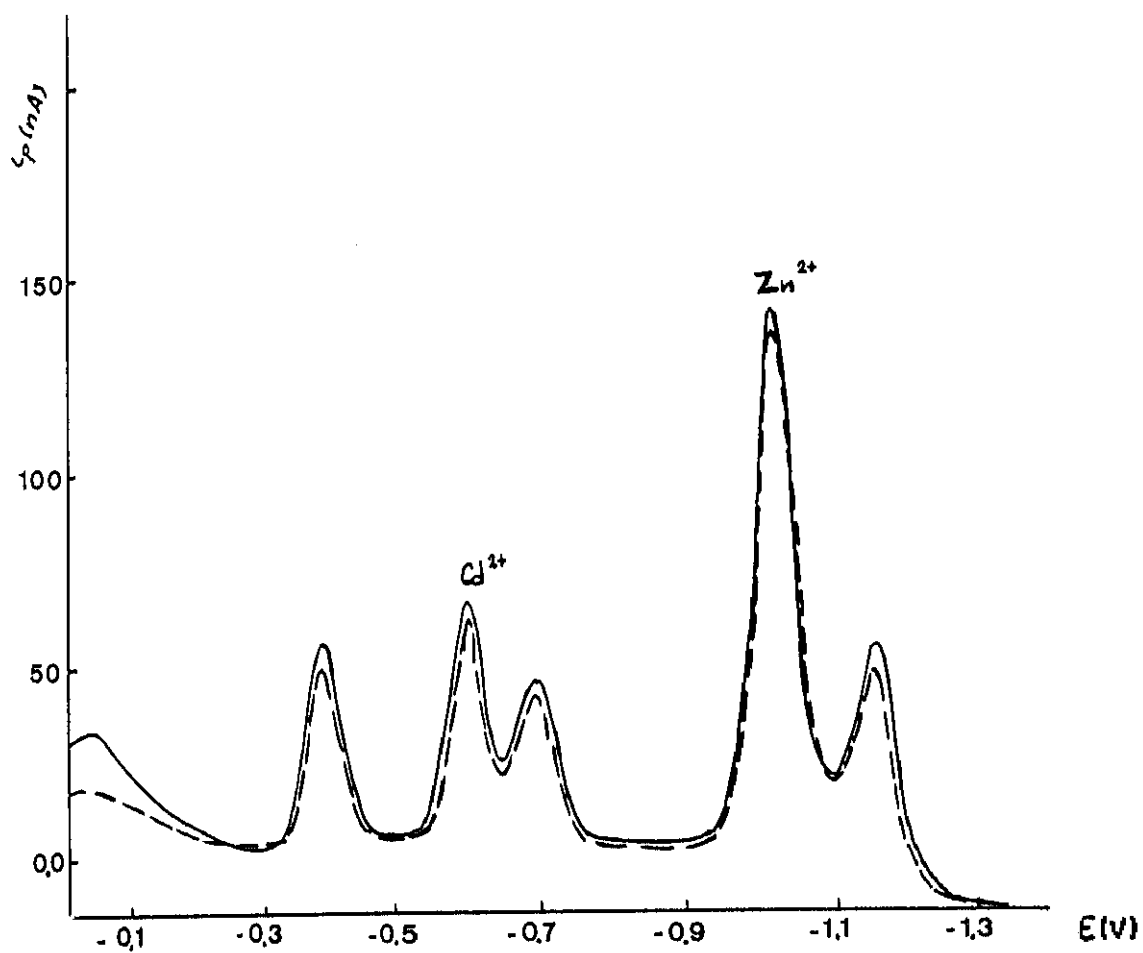


Fig. 139. D.P.P. de una disolución de fragmento ($1.56 \cdot 10^{-3}$ M) + $CdCl_2$ ($8.4 \cdot 10^{-3}$ M) + $ZnCl_2$ ($1.16 \cdot 10^{-3}$ M) preparadas en $TRIS^+HCl$ $2.5 \cdot 10^{-2}$ M a pH 7.5, en función del tiempo: (a) recién preparada y (b) a las 96 h.

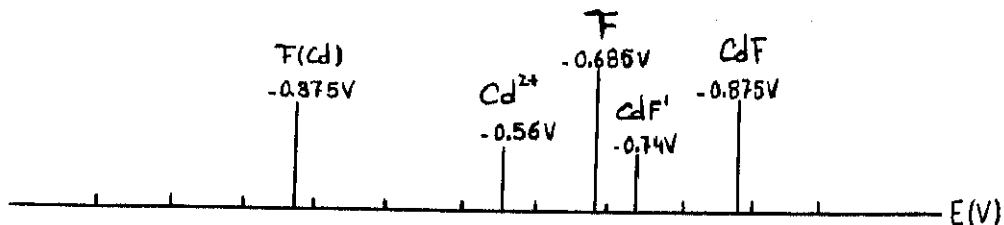
V.C.3.C. ADICIONES PATRON DE CADMIO Y/O ZINC

a) Adiciones patrón de CdCl_2 al fragmento 56-61 de MT

Se presenta en primer lugar los resultados obtenidos (Cedidos por el Dr. Jaques Chivot) de las adiciones de cadmio a una disolución de fragmento de concentración $2.53 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ en tampón borato, $\text{pH}=9.0$.

La evolución de los polarogramas a medida que la concentración de cadmio aumenta en la disolución muestra la progresiva formación del complejo cadmio-fragmento ($E_p = -0.875 \text{ V}$) así como la disminución del pico correspondiente al fragmento libre ($E_p = -0.685 \text{ V}$). Al llegar a una concentración dada $\text{Cd}/\text{F} \approx 0.6$ para la que aparentemente la formación del complejo $\text{Cd}-\text{F}$ es completa comienza a parecer otro pico para potenciales más negativos ($E_p = -0.74 \text{ V}$) que se ha atribuido a otro complejo de cadmio con el fragmento menos estable que el precedente. Ocurre, por lo tanto, un fenómeno análogo al descrito para el caso de las metalotineínas para el que se han encontrado dos complejos con el cadmio de estabilidad diferente. A este complejo se le ha denominado $\text{Cd}-\text{F}'$. Cuando la concentración de cadmio es igual a la inicial de fragmento aparece el pico correspondiente al cadmio libre en exceso, que aumento, como cabe esperar, para cada adición.

Lo descrito, con un diagrama de potenciales para cada uno de los picos, se ilustra en la figura 140.



Siendo: F, el pico correspondiente al fragmento solo
 $\text{F}(\text{Cd})$, al fragmento en presencia de cadmio
 CdF , el debido al catión cadmio complejoado

CdF' , a otro complejo mas débil del cadmio
 Cd^{2+} , asociado al catión cadmio libre

El pico atribuido al fragmento sólo va desapareciendo a medida que se realizan sucesivas adiciones de CdCl_2 , lo que conlleva la formación de un complejo cadmio-fragmento, que se manifiesta por la aparición de dos picos, el atribuido al complejo Cd-F y el atribuido a la parte orgánica de la molécula en presencia de cadmio, $\text{E}(\text{F}_{\text{Cd}})$, que van aumentando progresivamente a medida que lo hacen las adiciones de sales de cadmio. Hay que indicar que estos compuestos presentan una cinética rápida ya que son picos agudos y bien definidos.

La variación de la intensidad de cada uno de los picos en función de la concentración de cadmio añadida se ilustra en la gráfica 141. En ella se ve claramente la evolución de los polarogramas. La intensidad de $i_{\text{P}_{\text{CdF}}}$ aumenta a medida que i_{P_F} disminuye, ambas con la misma pendiente, hasta llegar a una relación de $\text{Cd/F} \approx 0.6$. A partir de esta relación $i_{\text{P}_{\text{CdF}}}$ aparece y aumenta hasta una relación $\text{Cd/F} \approx 1$, para la que se obtiene un valor constante. A esa concentración se detecta la presencia de cadmio libre e $i_{\text{P}_{\text{Cd}^{2+}}}$ aumenta linealmente. Por otra parte la intensidad, $i_{\text{P}_{\text{F}(\text{Cd})}}$, atribuida a la parte orgánica del fragmento, es decir a la oxidación del mercurio en presencia de complejo Cd-F , aumenta hasta alcanzar una meseta para la misma relación de cadmio, $C_{\text{Cd}} = C_{\text{F}}$.

Un hecho importante es que la pendiente de la recta $i_{\text{P}_{\text{CdF}}, \text{CdF}'} = f(C_{\text{Cd}})$ es aproximadamente la mitad de la $i_{\text{P}_{\text{F}(\text{Cd})}} = f(C_{\text{Cd}})$, lo que parece indicar que el número de electrones que participan en la oxidación del mercurio en presencia de la parte orgánica de la molécula es la mitad que en el caso de la reducción del cadmio complejado. la ambigüedad en el proceso de oxidación del mercurio sigue existiendo.

Es interesante hacer notar que la relación de intensidades, en un valor máximo, de los dos complejos de cadmio, Cd-F y $\text{Cd-F}'$,

Influencia de la adición de cadmio a bajas concentraciones sobre el fragmento

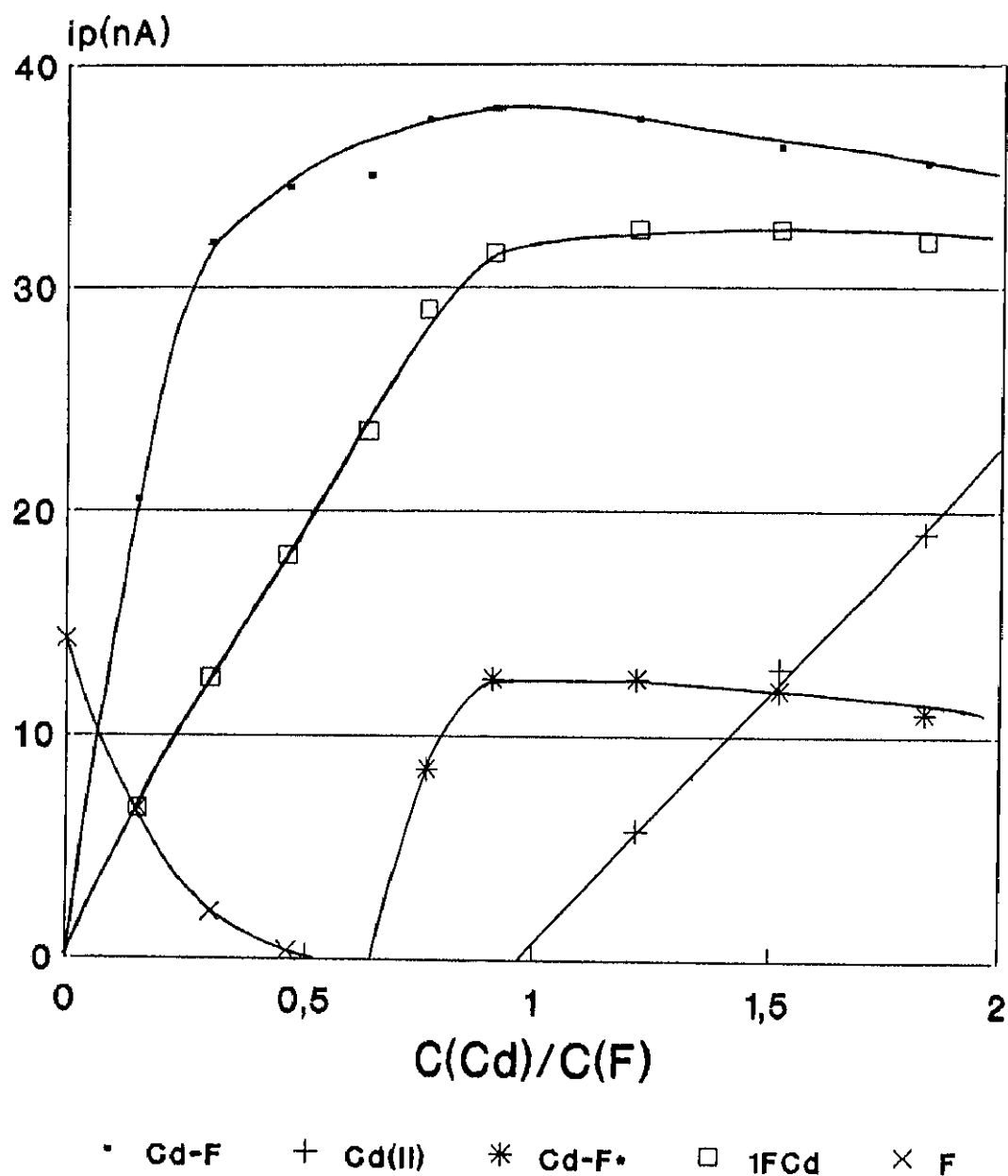


Fig. 141. Influencia de la adición de cadmio sobre la intensidad de los diferentes picos obtenidos cuando se añade a una disolución de fragmento.

es aproximadamente igual a 3, lo que indicaría que la relación Cd/F en el complejo que se forma primero, con constante de estabilidad más elevada, sería tres veces la del complejo que se forma después con constante de estabilidad más pequeña. Aunque el orden de formación de los complejos está en concordancia con la secuencia de sus constantes de estabilidad no se considere como normal que se forme, en exceso de ligando o, lo que es lo mismo, para concentraciones de catión pequeñas el complejo con una relación Cd/F mayor.

Las consideraciones que se pueden deducir de los resultados polarográficos están de acuerdo con lo expuesto en el capítulo de espectrofotometría en relación con el estudio de la complejación cadmio-fragmento, es decir es probable que existan dos complejos aunque con el método espectrofotométrico no se pueden diferenciar. El complejo global de estequiometría probable Cd:F = 1:1 con una coordinación de tres cisteínas con grupos tiólicos contenidos en el fragmento sería la contribución de dos complejos de estequiometría y constantes de estabilidad diferentes.

b) Adiciones patrón de cadmio y zinc sobre una disolución de fragmento preparada en TRIS·HCl

Se ha realizado la medida de la respuesta polarográfica del fragmento sólo y en presencia de cantidades crecientes de cadmio y zinc. Estas medidas se han llevado a cabo a pH diferentes, ácido, neutro o alcalino, para investigar la influencia de este parámetro.

Debe señalarse que este estudio no se ha realizado para cantidades de cadmio o zinc menores a la concentración de fragmento. Por lo tanto, se pueden hacer una serie de observaciones de manera general, indicando las diferencias y analogías que se encuentran para los dos cationes y para cada uno de los pH estudiados.

En cada uno de los casos analizados en primer lugar se analiza la evolución que sufren los perfiles polarográficos en función de la cantidad de catión añadido, ésta puede incluir el desplazamiento de los picos y, en ocasiones, el desdoblamiento de los mismos. Hay que señalar que los polarogramas son más complicados con cantidades crecientes de Cd^{2+} y/o Zn^{2+} . En segundo lugar, se analiza la intensidad de señal en función de la cantidad de cadmio añadido.

b₁) pH = 8.9 y 7.5

La evolución de los polarogramas es semejante para ambos pH (fig. 141-144), pero se encuentran diferencias apreciables con respecto a la naturaleza del catión metálico, lo que confirma, una vez más que el comportamiento polarográfico del Zn-F y se supone que, en general, Zn-proteína, es diferente que el del cadmio (334).

La primera adición de cada uno de los cationes provoca, como ya se ha indicado, un desplazamiento hacia potenciales mas negativos (fig. 141a-144a) que se ha atribuido a la reducción del catión metálico complejado con el fragmento.

Por otra parte el pico atribuido al fragmento se desplaza hacia potenciales más positivos (fig. 147). La magnitud del desplazamiento depende del catión y del pH.

$$\begin{aligned} \Delta E (F-F_{\text{Cd}}) &> \Delta E (F-F_{\text{Zn}}) \\ \Delta E [F-(F_{\text{Cd}} \text{ o } F_{\text{Zn}})]_{8.94} &> \Delta E [F-(F_{\text{Cd}} \text{ o } F_{\text{Zn}})]_{7.5} \end{aligned}$$

En el caso de la adición de los dos cationes simultaneamente (fig. 145 y 146) la diferencia de potenciales entre el pico del fragmento en ausencia de metales y en presencia de los mismos es análoga a la que se produce cuando solamente se añade cadmio. Como la constante de estabilidad del complejo cadmio-fragmento es mayor que la correspondiente al zinc-fragmento como se puede

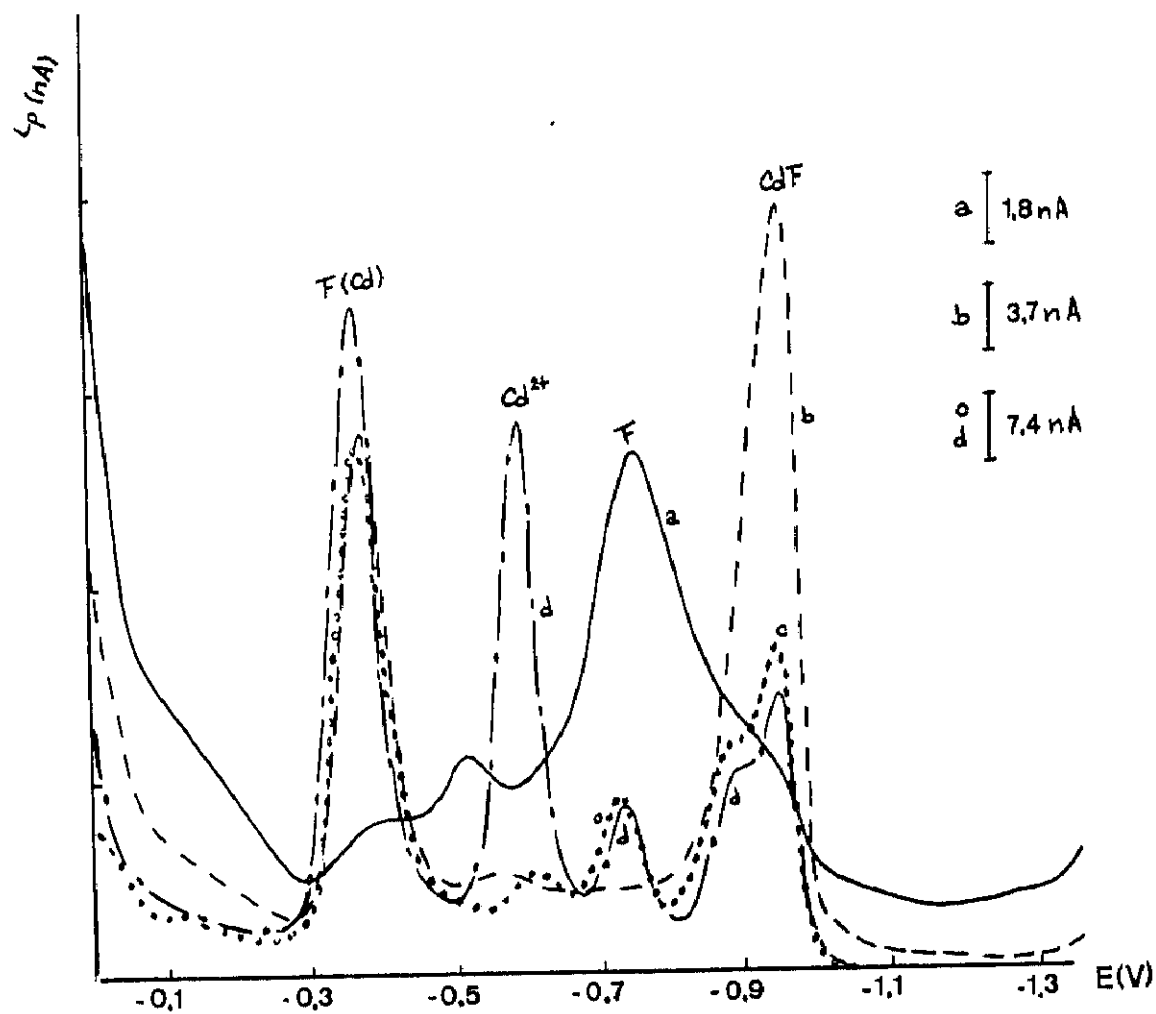


Fig. 141. D.P.P. de: (a) una disolución de fragmento, $1.56 \cdot 10^{-3} M$, (b) fragmento + $3.87 \cdot 10^{-5} M$ de $CdCl_2$, (c) fragmento + $7.42 \cdot 10^{-5} M$ de $CdCl_2$, y (d) fragmento + $1.07 \cdot 10^{-4} M$ en TRIS HCl $2.5 \cdot 10^{-2} M$ a $pH=8.94$.

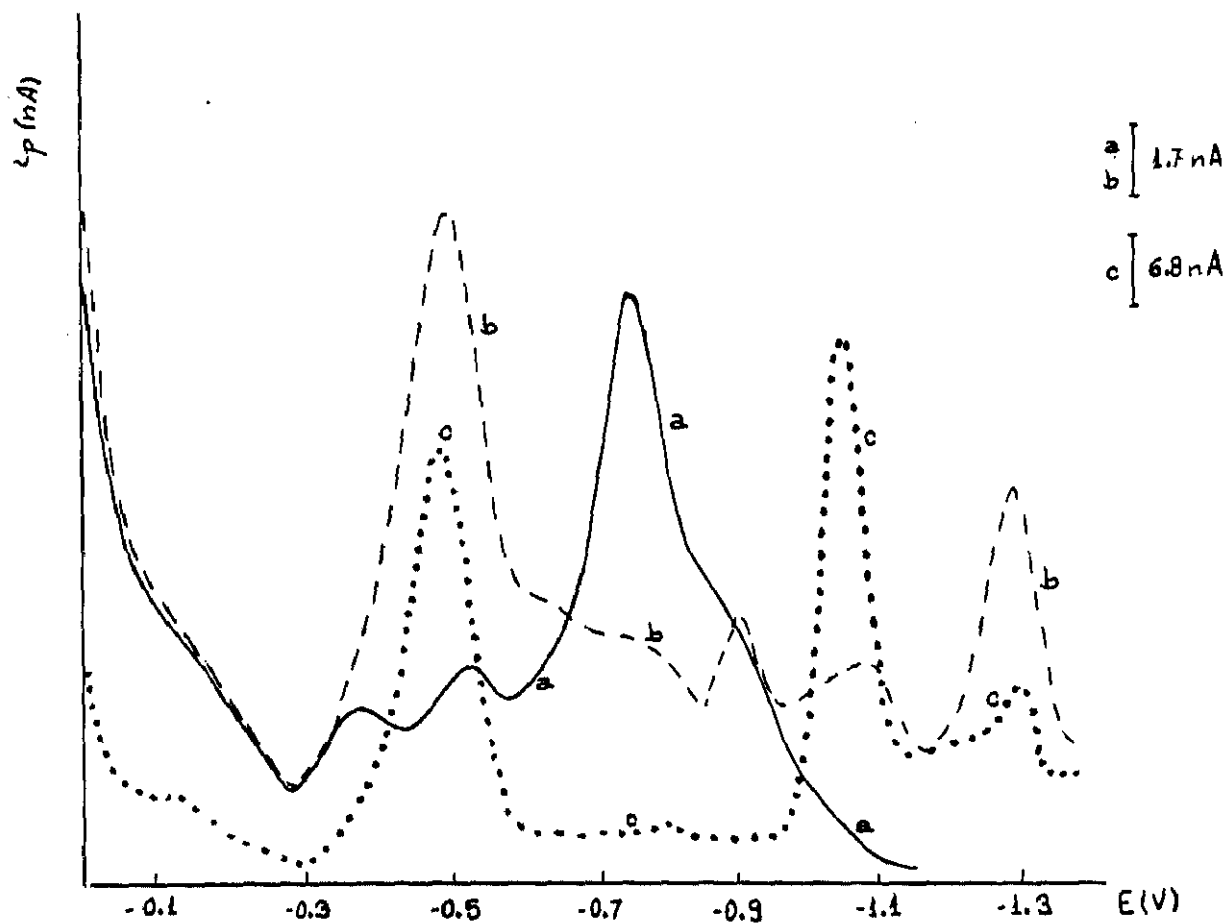


Fig. 142. D.P.P. de: (a) una disolución de fragmento, $1.56 \cdot 10^{-5}$ M, (b) fragmento + $3.4 \cdot 10^{-5}$ M de ZnCl_2 , (c) fragmento + $9.77 \cdot 10^{-5}$ M ZnCl_2 en TRIS HCl $2.5 \cdot 10^{-2}$ M a pH 8.94.

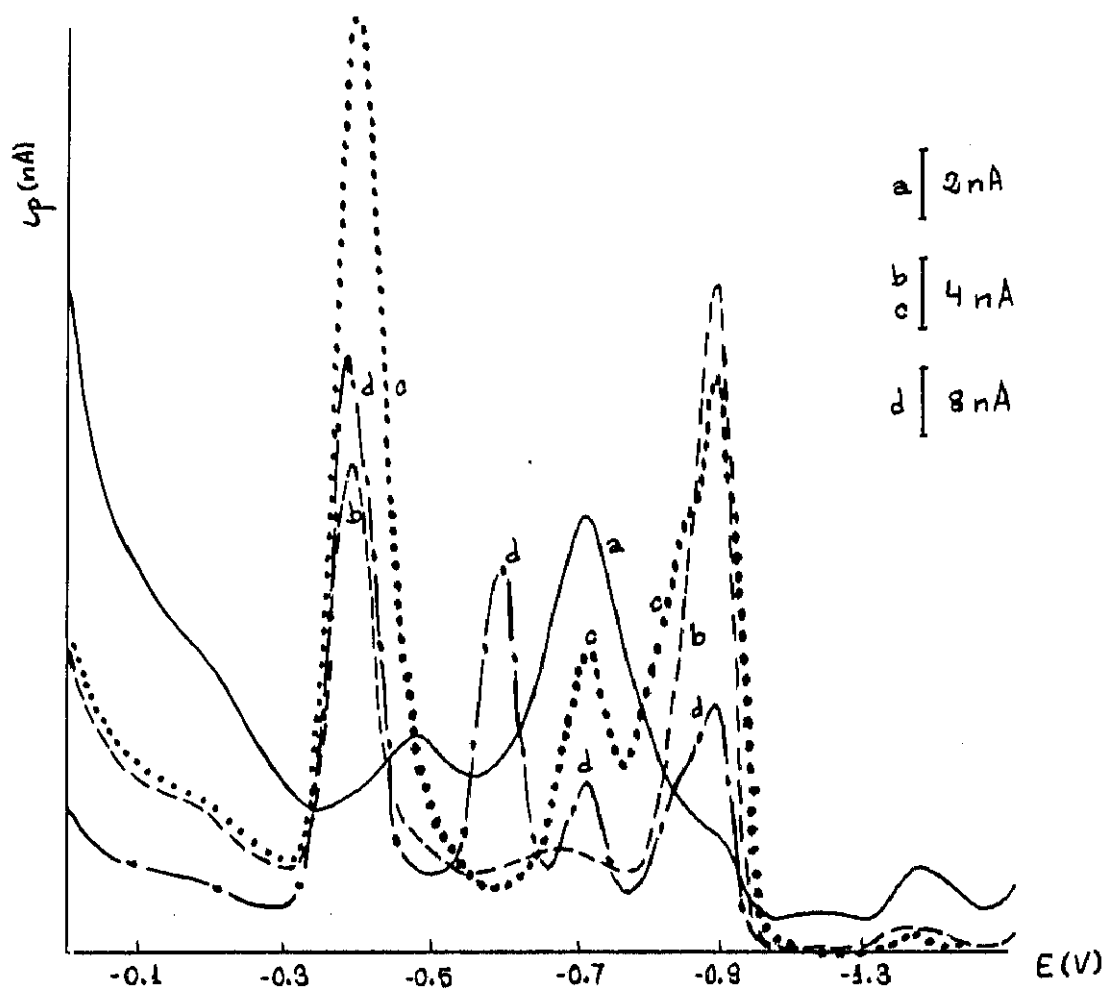


Fig. 143. D.P.P. de: (a) una disolución de fragmento, $1.56 \cdot 10^{-3}$ M, (b) fragmento + $3.4 \cdot 10^{-5}$ M de CdCl_2 , (c) fragmento + $6.59 \cdot 10^{-5}$ M de CdCl_2 , y (d) fragmento + $9.54 \cdot 10^{-5}$ M CdCl_2 , en TRIS HCl $2.5 \cdot 10^{-2}$ M a pH 7.5.

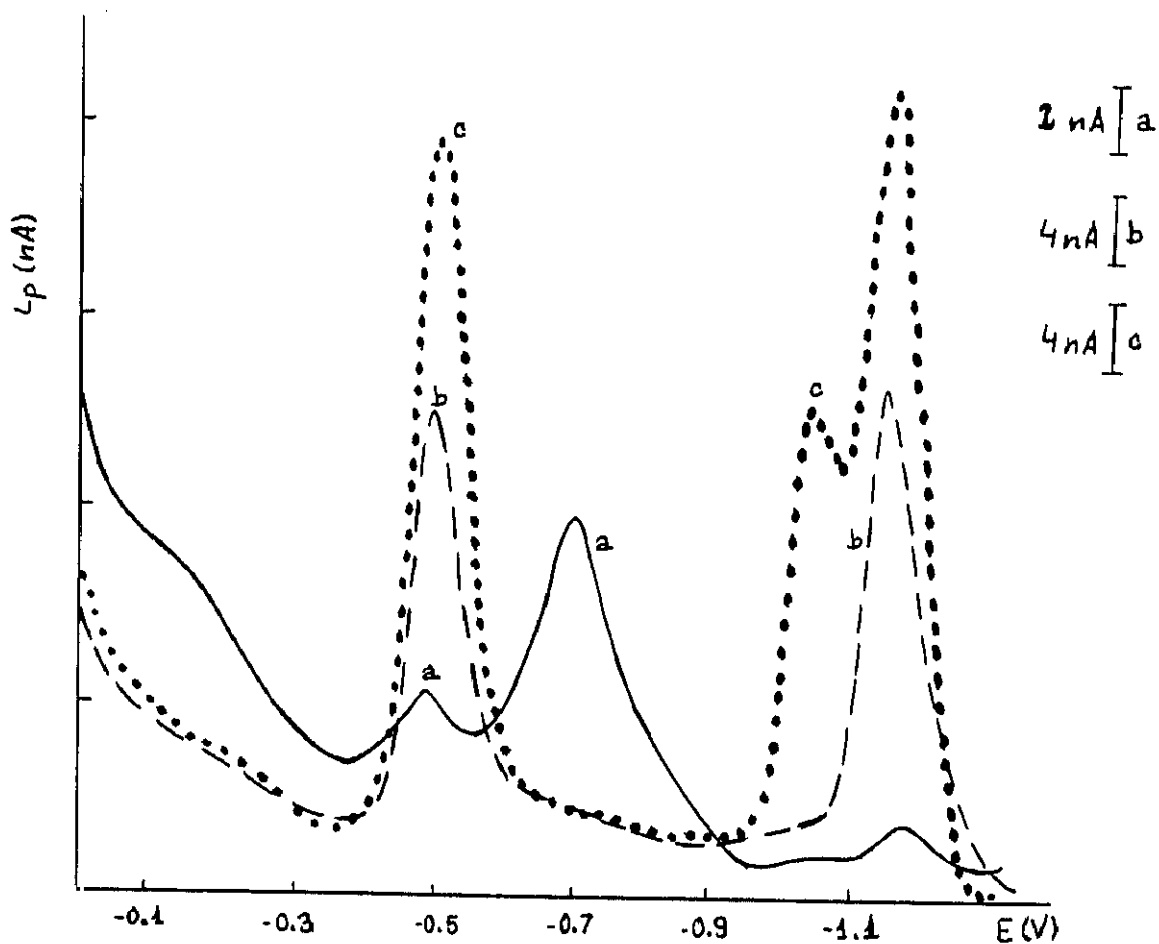


Fig. 144. D.P.P. de: (a) una disolución de fragmento, $1.56 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, (b) fragmento + $3.4 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ de ZnCl_2 , (c) fragmento + $6.65 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ ZnCl_2 , en TRIS HCl $2.5 \cdot 10^{-2} \text{ M}$ a pH 7.5.

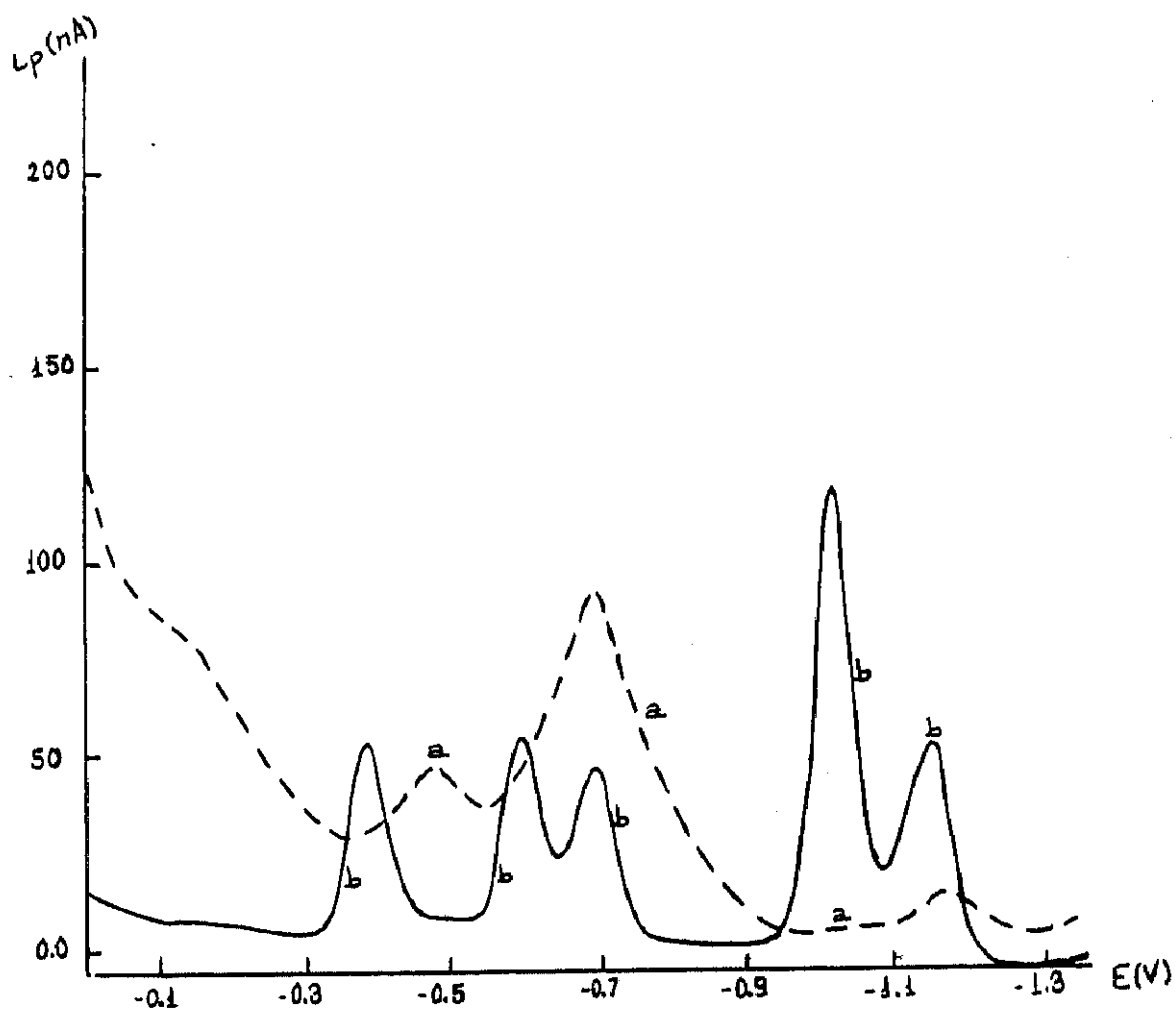


Fig. 145. D.P.P. de: (a) una disolución de fragmento, $1.56 \cdot 10^{-5} \text{ M}$,
 (b) fragmento + $1.16 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ de ZnCl_2 + $8.4 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ CdCl_2 ,
 en TRIS HCl $2.5 \cdot 10^{-2} \text{ M}$ a pH 7.5.

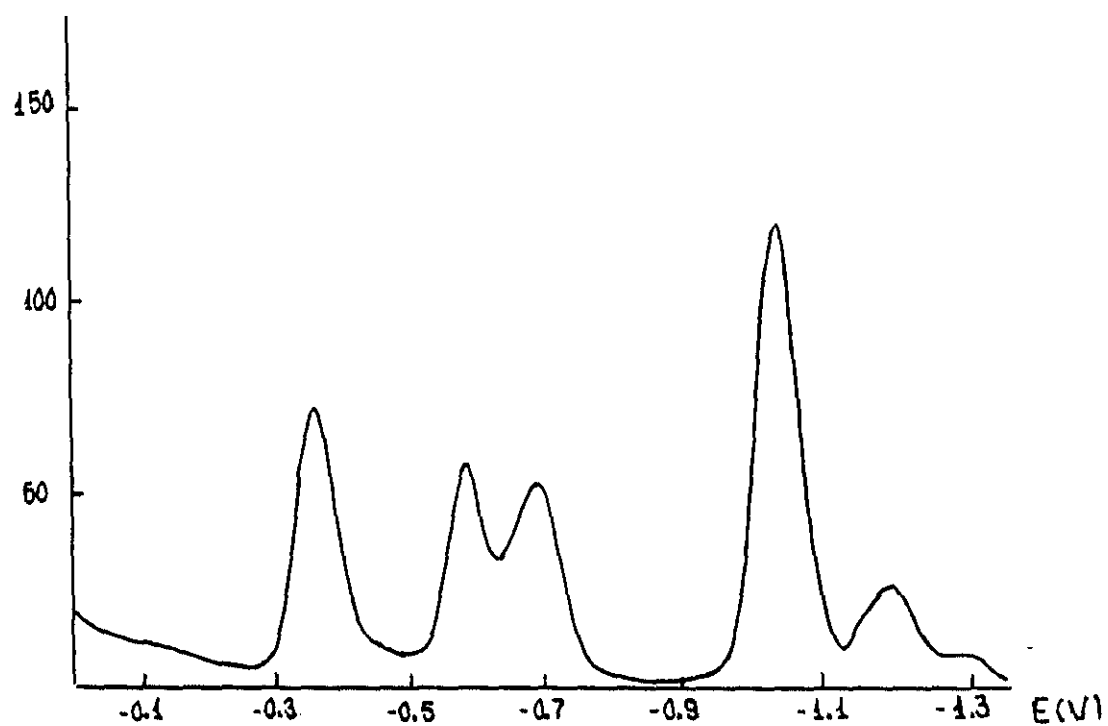
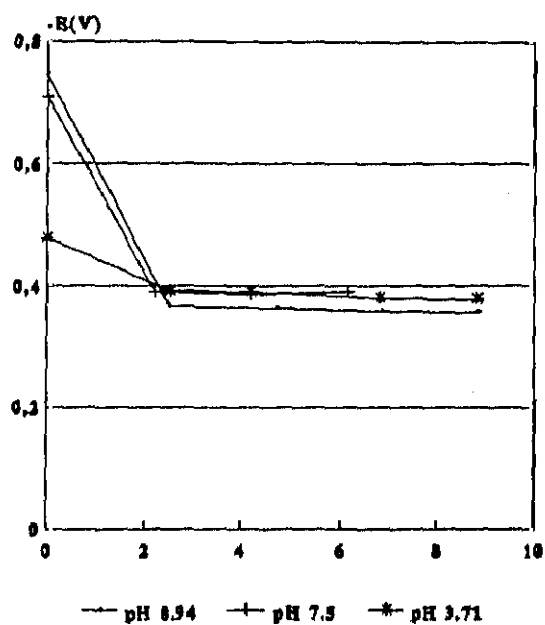


Fig. 146. D.P.P. de: (a) una disolución de fragmento, $1.56 \cdot 10^{-5} \text{ M}$,
 (b) fragmento + $1.16 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ de ZnCl_2 + $8.4 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ CdCl_2 ,
 en TRIS HCl $2.5 \cdot 10^{-1} \text{ M}$ a pH 8.94.

Variación de E_p del fragmento en función de la relación de concentración Cd/frag.



Variación de E_p del fragmento en función de la relación de concentración Zn/frag.

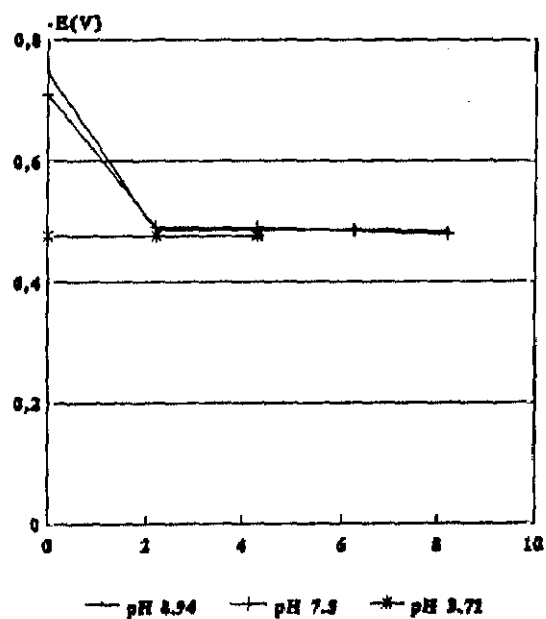


Fig. 147. Variación del potencial atribuido a la oxidación del mercurio en presencia de fragmento: (a) tras la adición de sales de cadmio y (b) tras la adición de sales de zinc.

deducir cualitativamente de lo ya expuesto es esta constante, la del Cd-F, la que rige el proceso electroquímico.

Estos picos se han atribuido a la reducción de los cationes contenidos en los complejos de Cd-F y Zn-F, respectivamente.

A medida que la cantidad de catión añadida aumenta, para el caso del zinc, se mantienen los dos picos mencionados y atribuidos al fragmento en presencia de zinc, $E_{p(Zn)F}$ y, al complejo fragmento-zinc. Para una concentración de zinc ($6.65 \cdot 10^{-5}$ M) aparece el pico correspondiente a la reducción de los iones Zn^{2+} (fig. 142 c y 144 c). Estos tres picos se mantienen sin que aparezca ningún otro, incluso para concentraciones de zinc diez veces superiores a la concentración inicial del fragmento. Sin embargo, si a esta disolución que contiene zinc en exceso y fragmento se le añade cadmio a una concentración próxima a la de zinc, el primer pico se desplaza al potencial correspondiente a la adición de cadmio sólo y aparece otro pico Cd-F' a -0.700 V como ya se ha indicado precedentemente (fig. 145 y 146). El potencial de este nuevo pico que aparece en presencia de zinc y cadmio es igual al potencial del complejo que se ha denominado Cd-F'. El $E_{p(CdF')}$ es parecido para estos dos pHs estudiados, aunque la altura de pico es idéntica para una cantidad igual de cadmio añadida.

Con respecto al cadmio, para una concentración de Cd(II) dos veces mayor a la del fragmento, $C_{Cd} \approx 2 C_F$, existen dos picos ya mencionados, el debido al fragmento y al complejo cadmio-fragmento (fig. 141 y 143). El pico del cadmio libre no aparece para $C_{Cd} \approx 5 C_F$, (curvas 141c y 143c), pero sí se observa claramente para $C_{Cd} = 7 C_F$ (curvas 141d y 143d). El pico que aparece a -0.9 V, aproximadamente y, atribuido al complejo Cd-F, se desdobra en dos, no bien separados, a medida que se añade Cd^{2+} . El desdoblamiento de este pico es más acusado a pH 8.94 que a pH 7.5. Lo más singular es la aparición del pico ya mencionado, $E_{pCdF'}$, que aparece a una concentración de cadmio añadida, $C_{Cd} \approx 5 \cdot C_F$, más pequeña que la necesaria para provocar la aparición del pico

correspondiente al catión cadmio libre (fig. 141c,d y 143c,d). La diferencia de potenciales, $\Delta E(\text{CdF}'-\text{Cd}^{2+})$ es ligeramente mayor a pH 8.94 que a pH 7.5. Aunque el intervalo de concentración de cadmio en medio TRIS no es análogo al que se ha expuesto en medio borato, los fenómenos que intervienen aparentemente son los mismos.

Cuando se analiza el desplazamiento que sufre el primer pico tras la adición de uno de los cationes y el que sufre el pico del catión complejoado con el fragmento respecto al del catión libre se observa que ambos son análogos a los dos pH estudiados (fig. 147).

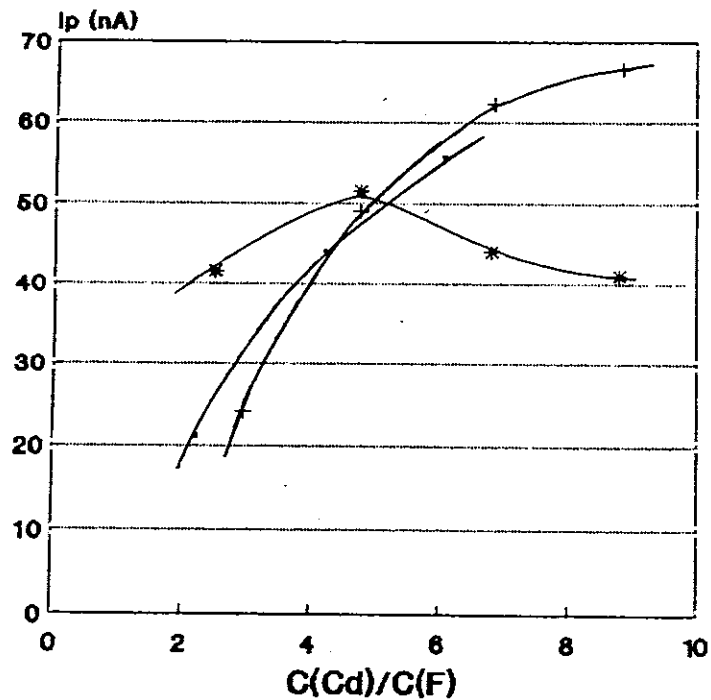
$$\begin{aligned} \Delta E (\text{F}-\text{F}_{\text{Cd}})_{7.5} &= 0.31 \approx \Delta E (\text{CdF}-\text{Cd}^{2+})_{7.5} = 0.30 \\ \Delta E (\text{F}-\text{F}_{\text{Cd}})_{8.94} &= 0.38 \approx \Delta E (\text{CdF}-\text{Cd}^{2+})_{8.94} = 0.36 \\ \Delta E (\text{F}-\text{F}_{\text{Zn}})_{7.5} &= 0.21 \approx \Delta E (\text{ZnF}-\text{Zn}^{2+})_{7.5} = 0.12 \\ \Delta E (\text{F}-\text{F}_{\text{Zn}})_{8.94} &= 0.27 \approx \Delta E (\text{ZnF}-\text{Zn}^{2+})_{8.94} = 0.24 \end{aligned}$$

La intensidad correspondiente al primer pico aumenta a medida que se añade catión metálico, cadmio o zinc. Se alcanza un valor constante para zinc cuando la relación $\text{Zn}/\text{F} \approx 6$ y cuando la relación $\text{Cd}/\text{F} \approx 4$ (pH=3.7) y $\text{Cd}/\text{F} \approx 6$ para pH 7.5 y 8.94. Para ambos pHs el valor absoluto y la relación i_p/C_M es mayor para el caso del cadmio (fig. 148).

Para el complejo Zn-F la señal $i_{p_{\text{ZnF}}}$ se mantiene prácticamente a partir de la primera adición de zinc igual a $C_{\text{Zn}}=2 C_F$ (fig. 149).

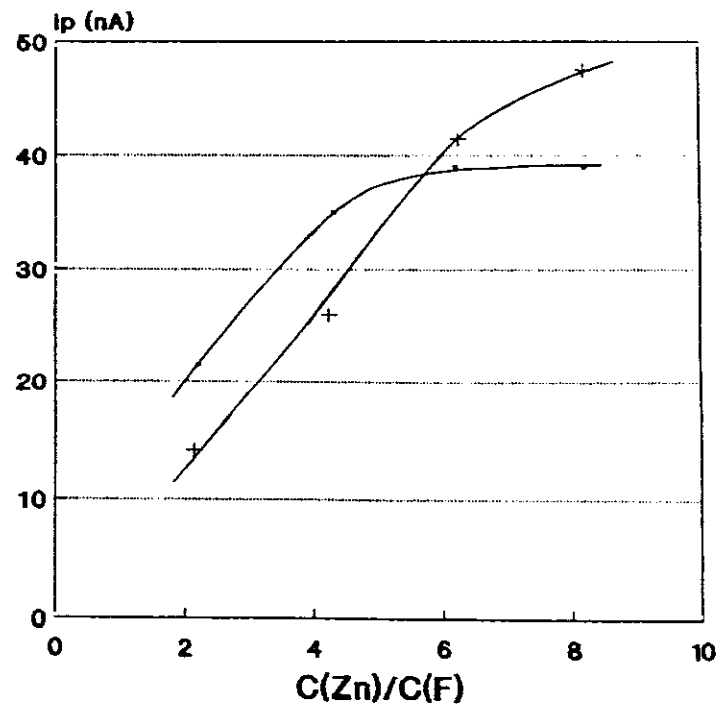
La intensidad del pico correspondiente al complejo Cd-F, aparentemente desdoblado en dos picos) disminuye lentamente a medida que la concentración de cadmio aumenta. Simultáneamente se observa una ligera variación hacia valores mayores de la señal, atribuida al complejo Cd-F'. A partir de una concentración de cadmio $C_{\text{Cd}} > 5-C_F$ aparece el cadmio libre y se ve claramente la presencia del complejo Cd-F y Cd-F' simultáneamente (fig. 150).

ip (Fragmento) en función de las adiciones de cadmio a diferentes pH



• pH 7.5 + pH 8.94 * pH 3.71

ip (Fragmento) en función de las adiciones de zinc a diferentes pH



• pH 7.5 + pH 8.94

Fig. 148. Variación de la intensidad del pico atribuido a la oxidación del mercurio en presencia de fragmento: (a) tras la adición de sales de cadmio y (b) tras la adición de sales de zinc, a diferentes pHs.

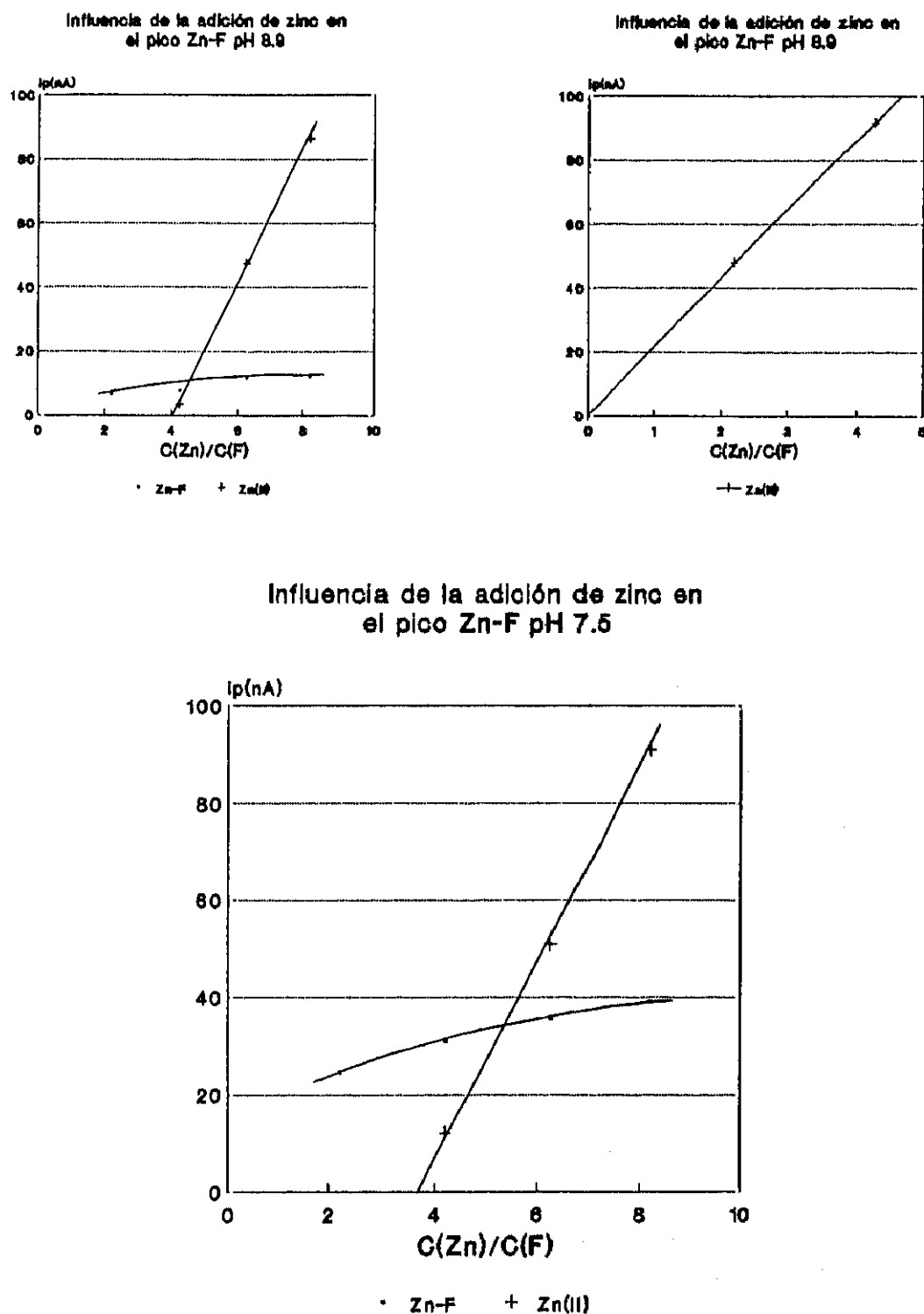


Fig. 149. Variación de la intensidad de cada uno de los picos que aparecen tras la adición de sales de zinc, a diferentes pHs.

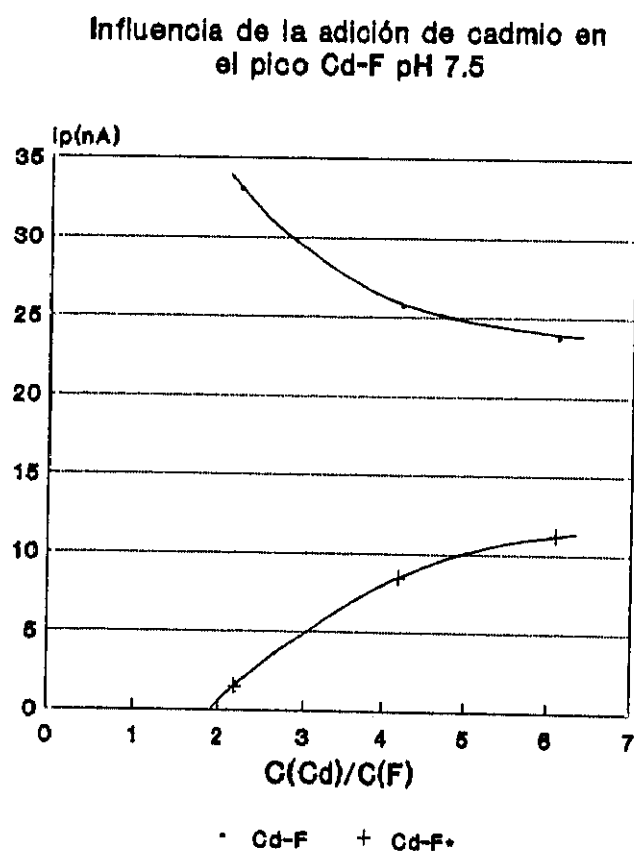
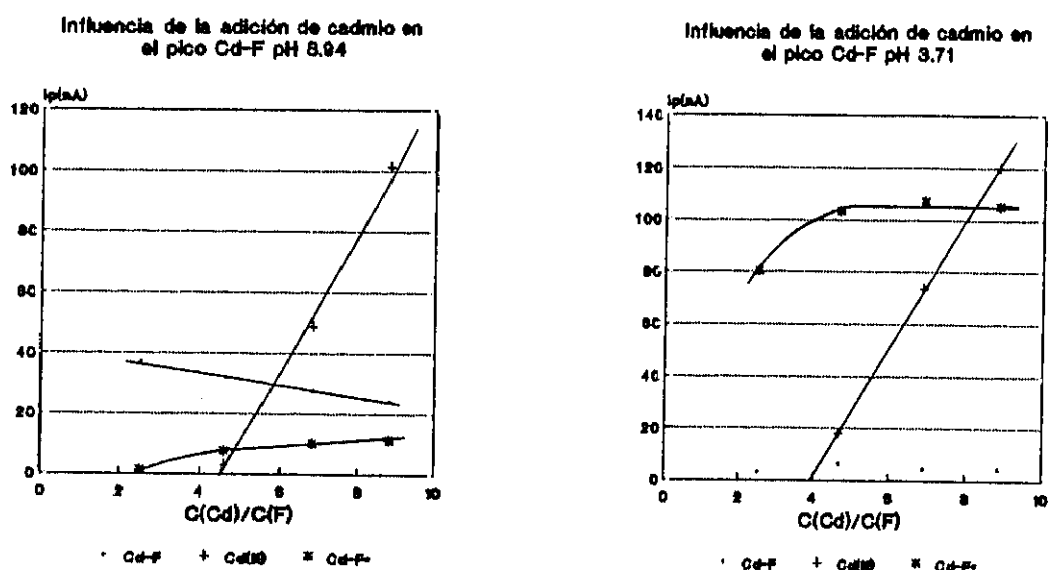


Fig. 150. Variación de la intensidad de cada uno de los picos que aparecen tras la adición de sales de cadmio, a diferentes pHs.

b₁) pH = 3.71

Análogamente a lo descrito precedentemente, la adición de cadmio provoca la aparición de los picos correspondientes al fragmento y al complejo Cd-F, no así el zinc que a este pH no se compleja con este péptido (fig. 151 y 152). Al igual que en el caso de pH básicos el desplazamiento del pico debido al fragmento es mayor cuando se adiciona cadmio, ya que el zinc al no asociarse al fragmento no provoca desplazamiento del pico (fig. 147).

$$\Delta E (F-F_{Cd}) > \Delta E (F-F_{Zn})$$

La diferencia mas importante de este pH con los básicos es que a este pH no aparece el pico atribuido a la formación del complejo Zn-F. Cuando se añade cadmio a la disolución que contiene zinc y fragmento, el primer pico se desplaza hacia potenciales el potencial del primer pico en presencia de cadmio (fig. 153), de manera análoga a como ocurría a pHs básicos.

En cuanto al pico Cd-F' no se observa, o bien, está englobado en el de Cd-F o Cd²⁺. Por la diferencia de potenciales $\Delta E(CdF-Cd^{2+}) > \Delta E(CdF'-Cd^{2+})$, el complejo Cd-F' es mas débil y no se produce su formación a pH ácidos aunque si se forma el Cd-F (fig. 152 b,c).

La intensidad del pico atribuido al fragmento no se modifica por las sucesivas adiciones de zinc, pero si lo hace la intensidad del pico debido al catión libre que aumenta de manera lineal a la adiciones de dicho catión. En el caso del cadmio la intensidad del pico atribuido al fragmento en presencia de cadmio permanece practicamente constante (fig. 148 b). Mientras que la intensidad del pico Cd-F aumenta tras la primera adición y se estabiliza a partir de una relación de concentraciones Cd/F \approx 4 (fig. 150), a partir de la cual aparece intensidad debida al

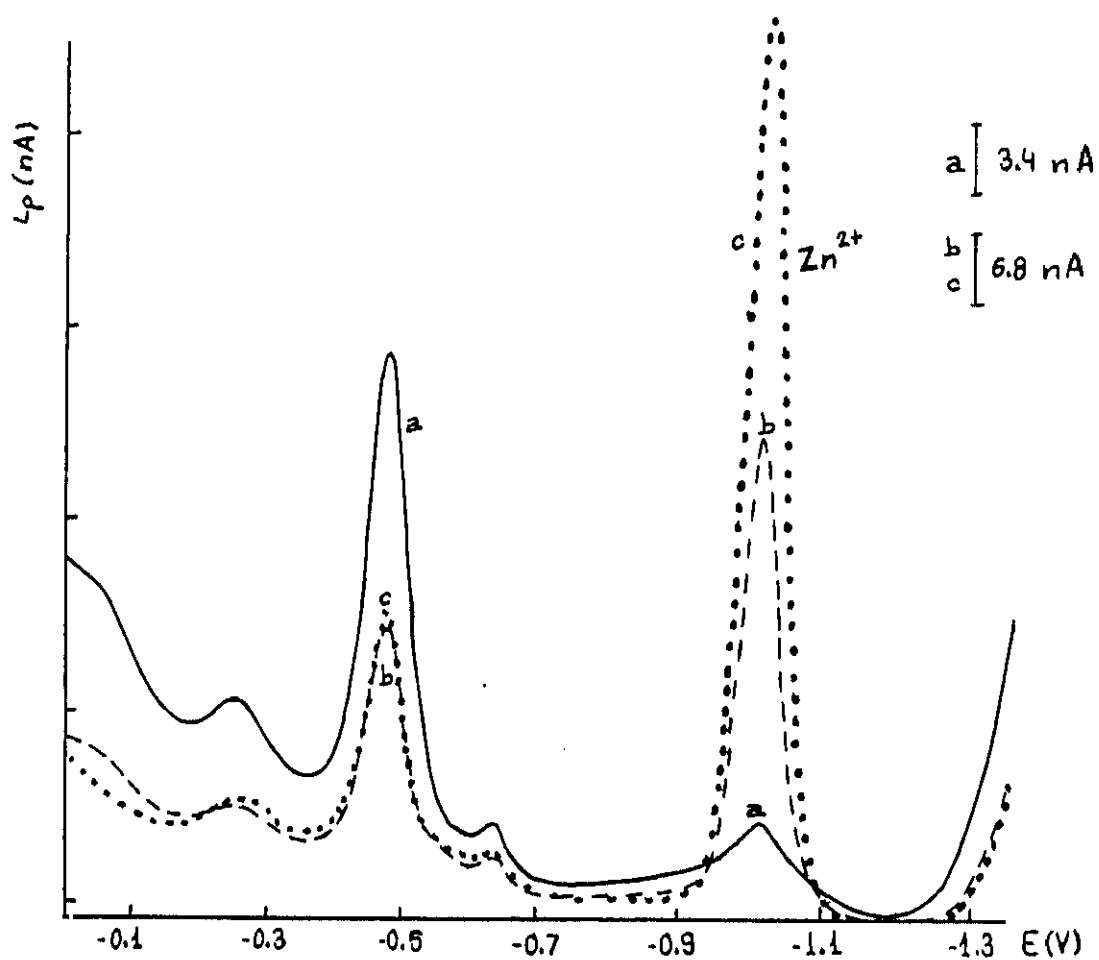


Fig. 151. D.P.P. de: (a) una disolución de fragmento, $1.56 \cdot 10^{-5}$ M, (b) fragmento + $3.4 \cdot 10^{-5}$ M de $ZnCl_2$ y (c) fragmento + $6.65 \cdot 10^{-5}$ M de $ZnCl_2$ en TRIS HCl $2.5 \cdot 10^{-2}$ M a pH 3.71.

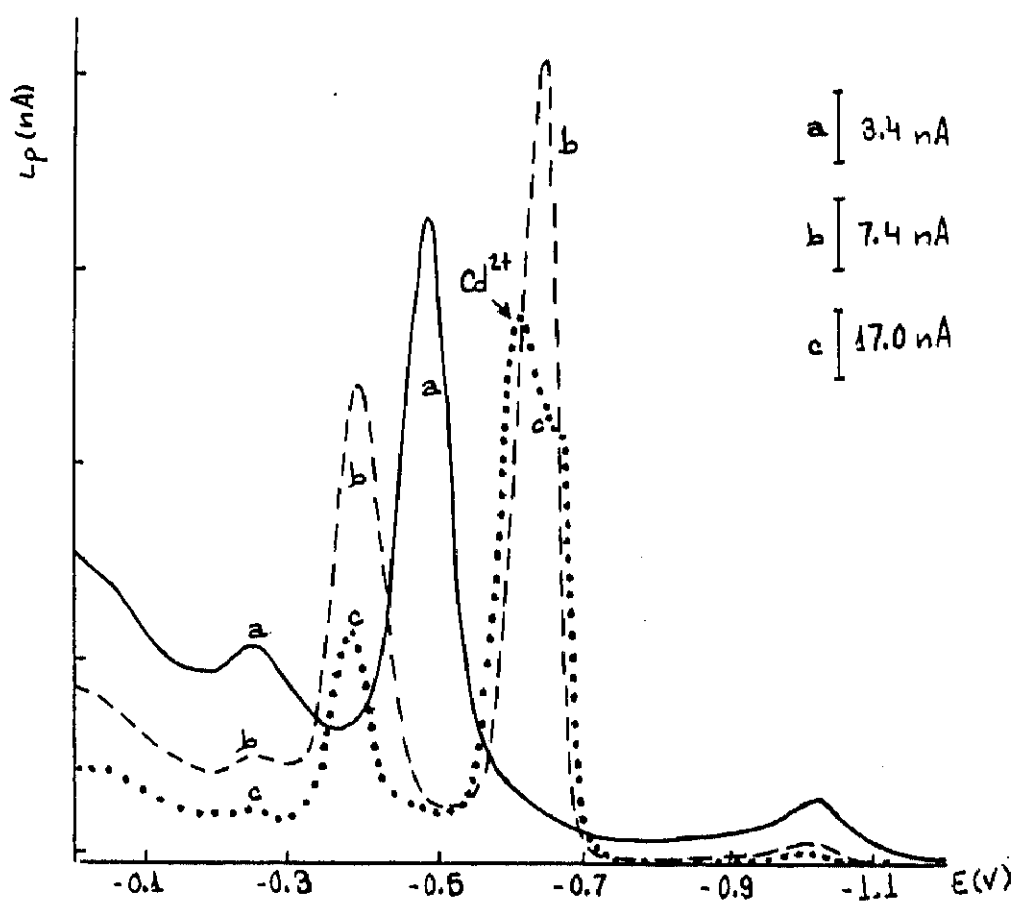


Fig. 152. D.P.P. de: (a) una disolución de fragmento, $1.56 \cdot 10^{-5}$ M, (b) fragmento + $3.87 \cdot 10^{-5}$ M de $CdCl_2$, y (c) fragmento + $1.07 \cdot 10^{-4}$ M de $CdCl_2$, en TRIS HCl $2.5 \cdot 10^{-2}$ M a pH 3.71.

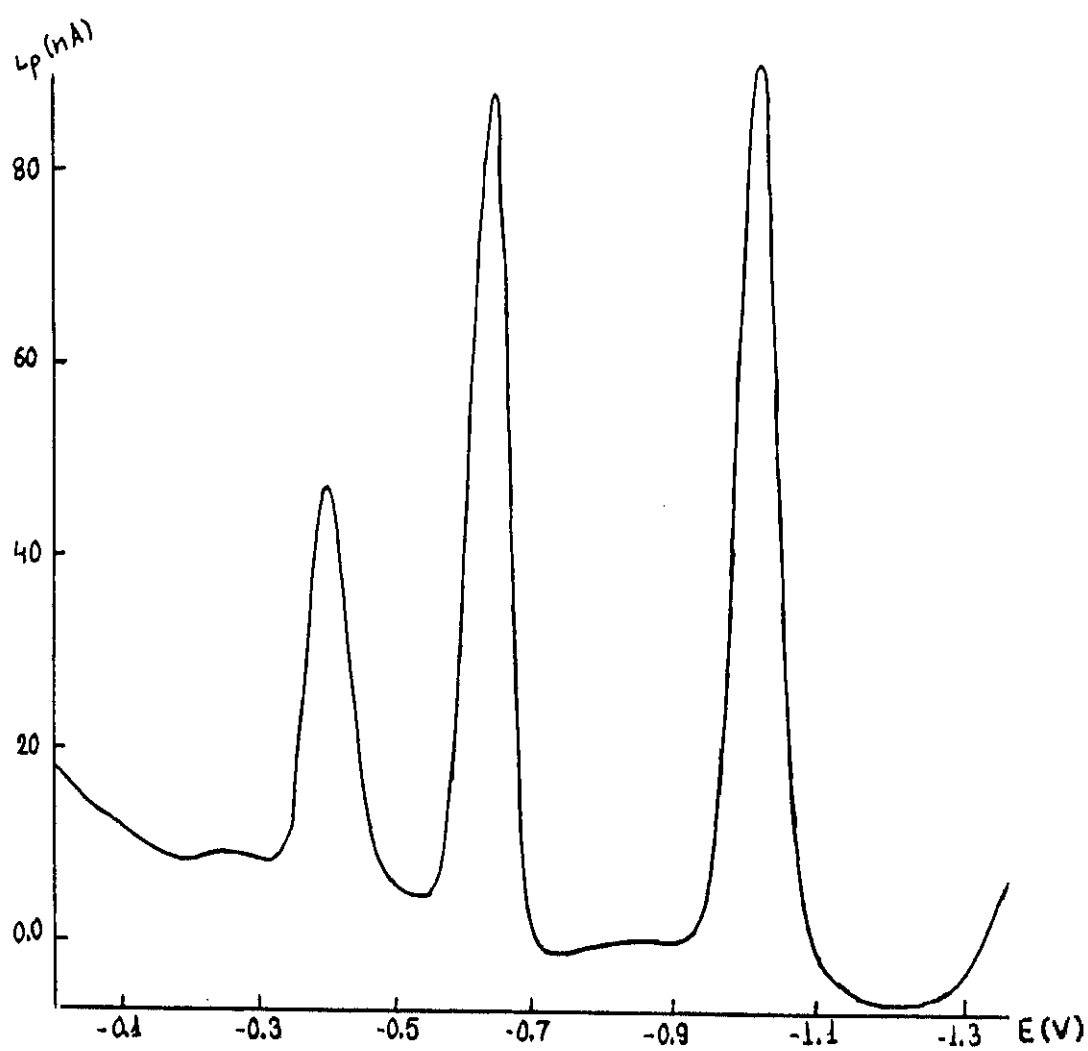


Fig. 153. D.P.P. de una disolución de fragmento, $1.56 \cdot 10^{-5}$ M en TRIS HCl $2.5 \cdot 10^{-3}$ M a pH 3.71 a la que se han adicionado $6.65 \cdot 10^{-3}$ M de $ZnCl_2$ y $8.73 \cdot 10^{-3}$ M de $CdCl_2$.

cación cadmio libre en disolución que aumenta de forma lineal con las posteriores adiciones de este catión a la disolución.

h_3) pH = 1.9

Los polarogramas son simples (fig. 154 y 155). El primer pico atribuido al fragmento y los dos picos correspondientes a los cationes libres no complejados por el fragmento, $E(Cd^{2+})$ y $E(Zn^{2+})$. También se observa que la adición de los cationes Cd^{2+} y Zn^{2+} no provoca desplazamiento del potencial del pico del fragmento, tal y como pasaba a pH básicos, ya que a este pH no se produce asociación, complejación, entre los cationes y el péptido.

En estas condiciones se puede comprobar que la intensidad del primer pico no varía tras las adiciones de cualquiera de los dos cationes, cadmio o zinc, como es lógico, ya que no ha aumentado la cantidad de grupos SH en disolución, grupos causantes de esta señal.

c) Constantes aparentes de estabilidad

Los valores de las constantes de estabilidad aparentes de los complejos metal-fragmento se pueden determinar a partir de las experiencias precedentes, es decir, las adiciones de cadmio y/o zinc a una disolución de fragmento a diferentes pH y la medida de las diferencias de potencial que se originan.

El valor de pK' se obtiene de manera aproximada a partir de la ecuación $\Delta E = (0.058/n)pK'$ tal y como se ha realizado en apartados para los complejos Cd-T y Zn-T.

Los pHs a los que estas constantes se han calculado, así como la diferencia de potenciales que se ha empleado en el cálculo se indican en la tabla 37.

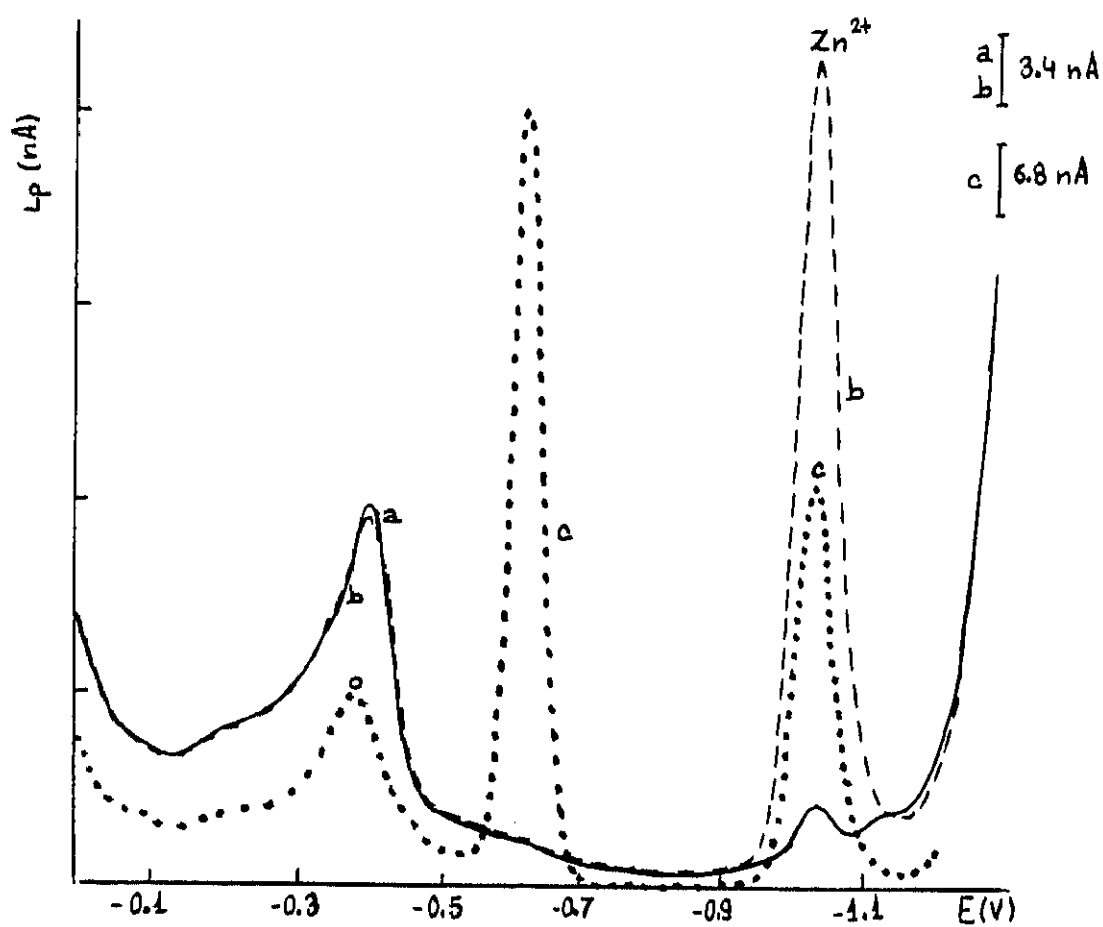


Fig. 154. D.P.P. de: (a) una disolución de fragmento, $1.56 \cdot 10^{-3}$ M, (b) fragmento + $6.12 \cdot 10^{-5}$ M de ZnCl_2 , y (c) fragmento + $6.12 \cdot 10^{-5}$ M ZnCl_2 + $6.59 \cdot 10^{-5}$ M de CdCl_2 , en TRIS HCl $2.5 \cdot 10^{-2}$ M a pH 1.9.

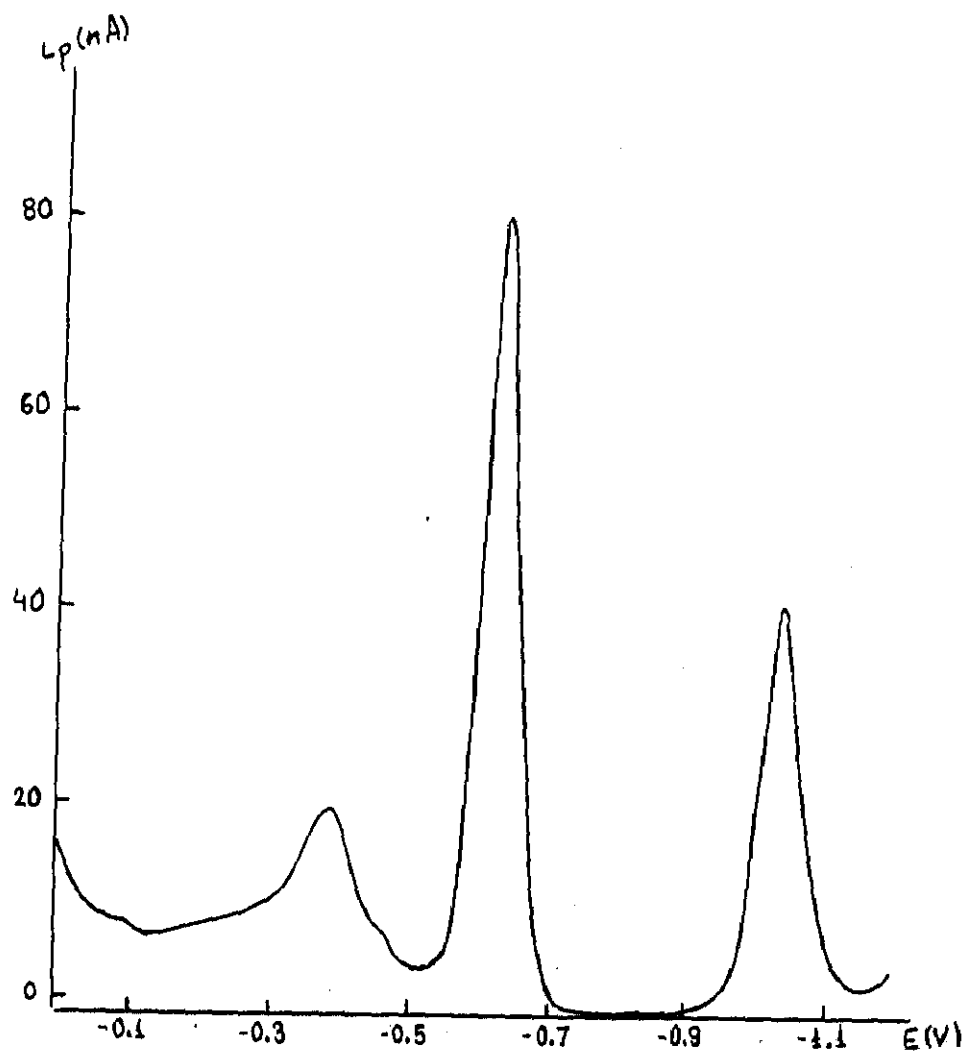


Fig. 155. D.P.P. de una disolución de fragmento, $1.56 \cdot 10^{-5}$ M en TRIS HCl $2.5 \cdot 10^{-2}$ M a pH 1.9 a la que se han adicionado $5.67 \cdot 10^{-5}$ M de $ZnCl_2$ y $6.59 \cdot 10^{-5}$ M de $CdCl_2$.

Tabla 37. Valores de las constantes aparentes de estabilidad para los complejos Cd-F y Cd-F' en TRIS·HCl a diferentes pHs y en tampón borato

TRIS·HCl	Cd-F		Cd-F'	
ENSAYO pH	$E(E_{CdF}-E_{Cd})$ en V	pK' Cd-F	$E(E_{CdF'}-E_{Zn})$ en V ^{Zn}	pK' Cd-F'
3.71	0.038-0.054	1.31-1.86	----	----
7.50	0.292-0.296	10.1-10.2	0.086-0.120	2.97-4.14
8.94	0.340-0.350	11.7.12.1	0.122-0.140	4.21-4.83

Tampón BORATO	$E(E_{CdF}-E_{Cd})$ en V	pK' Cd-F	$E(E_{CdF'}-E_{Cd})$ en V ^{Cd}	pK' Cd-F'
pH 9.0	0.19	6.55	0.055	1.9

Tabla 38. Valores de las constantes aparentes de estabilidad para los complejos Zn-F en función del pH de la disolución del TRIS·HCl

TRIS·HCl	Zn-F	
ENSAYO EN FUNCION pH	$E(E_{CdF}-E_{Cd})$ en V ^{Cd}	pK' Cd-F
7.5	0.134-0.144	4.62-4.97
8.94	0.200-0.210	6.90-7.24

A partir de la gráfica en que se representa $pK'=f(pH)$ se puede observar que las constantes de estabilidad del complejo Zn-F es menor que el de los Cd-F a todos los pHs estudiados, de forma análoga a como ocurría en el caso de la MT (fig. 156).

$pK'(\text{Cd-T})$ y $pK'(\text{Zn-T})$ en función del pH

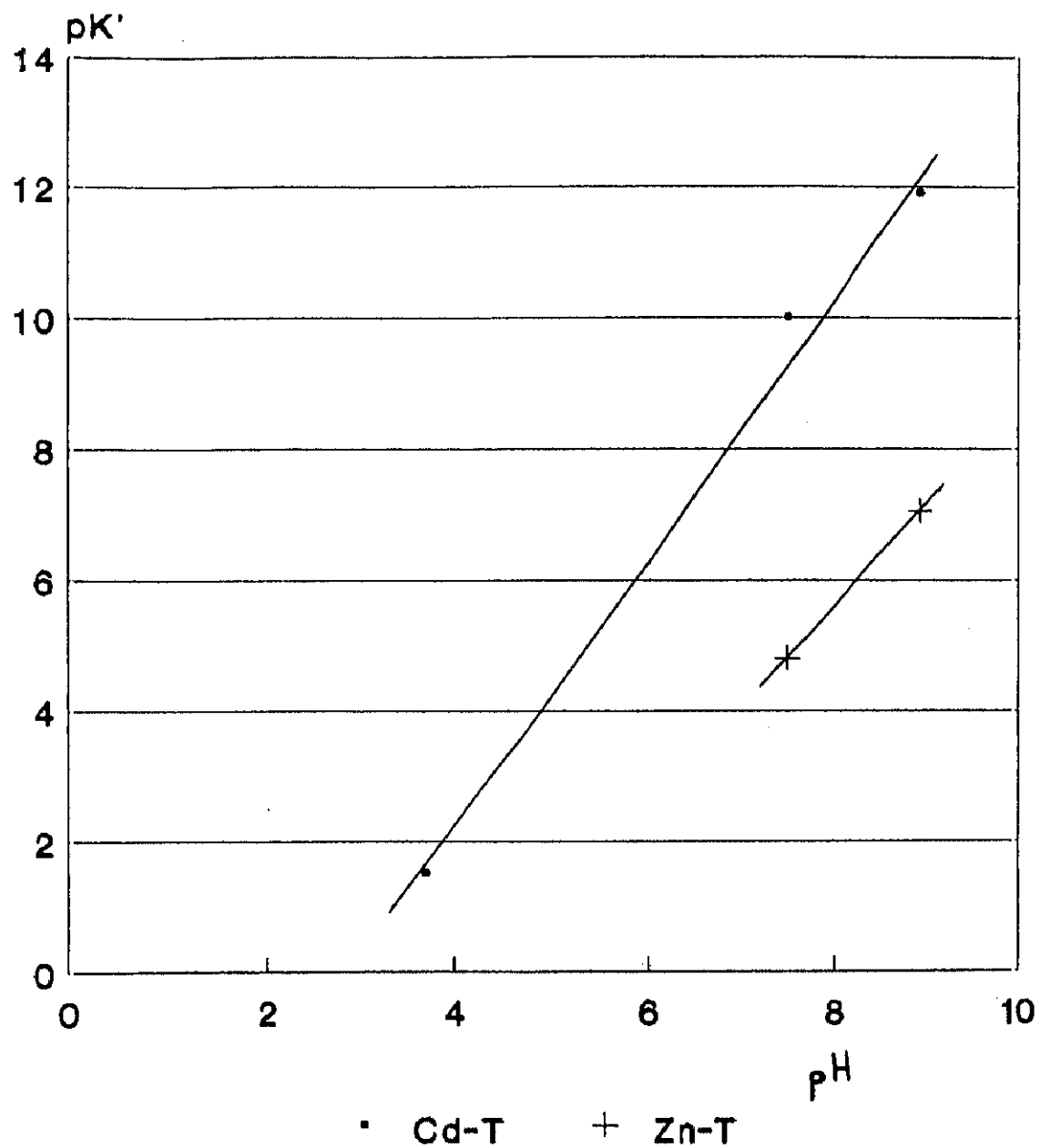


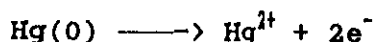
Fig. 136. Valores de $pK'(\text{Cd-T})$ y $pK'(\text{Zn-T})$ en función del pH

Con los tres puntos que constituyen la recta la pendiente $\log K'_{\text{cdF}} = f(\text{pH})$ aproximadamente iguala a 2 tiene el mismo valor que la correspondiente a Cd-F. Si por los dos puntos correspondientes a Zn-F se traza una recta ésta tiene pendiente diferente a la precedente y menor que para $\log K'_{\text{znF}} = f(\text{pH})$. Se puede indicar, por lo tanto, que probablemente el cadmio y el zinc forman con el fragmento complejos de naturaleza diferente, de manera análoga a la que se ha indicado en el caso de las metalotioneínas (334).

Sin embargo el complejo de cadmio-proteína depende, no solo de la naturaleza de la parte orgánica involucrada en el enlace, aunque presentan valores próximos de pK' , sino también y principalmente de la presencia de otros cationes que puedan ejercer un equilibrio competitivo con el cadmio por la proteína.

d) Discusión

Si se admite, como ya se ha indicado que en el mecanismo de oxidación del mercurio en presencia del fragmento intervienen dos electrones



se pueden relacionar los diversos potenciales a los que aparecen los picos.

Las constantes de asociación Hg-F se pueden deducir a partir del potencial de oxidación del electrodo de mercurio en el medio considerado en ausencia de cualquier compuesto en disolución. En medio TRIS HCl ($2.5 \cdot 10^{-2}$ M) el potencial de oxido-reducción del mercurio, $\text{Hg(II)}/\text{Hg(0)}$ es aproximadamente +0.1 V.

Así mismo, las constantes de formación de los complejos Cd-F y Zn-F se han deducido de la diferencia de potencial entre el catión libre y el catión complejoado.

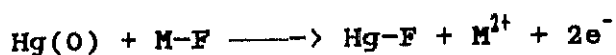
Estas constantes se agrupan de nuevo en la tabla 39.

Tabla 39. Valores de las constantes metal-fragmento a diferentes pHs

TRIS HCl pH:	K' (HgF)	K' (CdF)	K' (ZnF)
7.50	26.6	10.1	4.8
8.94	28.3	12.0	7.1

En primer lugar se puede señalar que el orden de estabilidad de las constantes $HgF > CdF > ZnF$ coincide con el dado en la literatura para las tioneínas o para péptidos de características análogas al que se ha empleado (11,12,15,31,66,72,83,100,102,103,116).

En segundo lugar se puede calcular teóricamente el valor del potencial al que debería aparecer el pico correspondiente al fragmento en presencia de cadmio y zinc a los dos pHs considerados. En efecto este valor de potencial depende de la diferencia entre los pK de disociación para los dos compuestos que intervienen en la reacción:



$$E_0' = E_0 - 0.029 (\log K_{HgF} - \log K_{MF})$$

siendo $E_0 = +0.1$ V.

Los valores calculados a partir de la ecuación y los experimentales se agrupan en la tabla 40.

Tabla 40. Valores experimentales y teóricos de los potenciales del
fragmento en presencia de cadmio y zinc

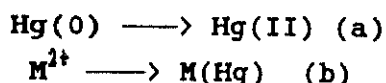
TRIS pH	$E'_{F(Cd)}(V)$ calculado	$E'_{F(Cd)}(V)$ experimental	$E'_{F(Zn)}(V)$ calculado	$E'_{F(Zn)}(V)$ experimental
7.50	0.379	0.38-0.39	0.532	0.492
8.94	0.372	0.36	0.514	0.488

Se observa que los valores experimentales son muy parecidos a los calculados lo que solo puede ser posible si el número de electrones que intervienen en ambos procesos, oxidación y reducción es el mismo.

De manera análoga la diferencia de potenciales entre el fragmento solo y en presencia de metales y los cationes solos y en presencia de fragmento son similares para un medio dado, como ya se ha indicado anteriormente

$$\begin{aligned}
 \Delta E (F-F_{Cd})_{7.5} &= 0.31 \approx \Delta E (CdF-Cd^{2+})_{7.5} = 0.30 \\
 \Delta E (F-F_{Cd})_{8.94} &= 0.38 \approx \Delta E (CdF-Cd^{2+})_{8.94} = 0.36 \\
 \Delta E (F-F_{Zn})_{7.5} &= 0.21 \approx \Delta E (ZnF-Zn^{2+})_{7.5} = 0.12 \\
 \Delta E (F-F_{Zn})_{8.94} &= 0.27 \approx \Delta E (ZnF-Zn^{2+})_{8.94} = 0.24
 \end{aligned}$$

Se trata de dos fenómenos diferentes una oxidación (a) y una reducción (b)



En el fenómeno de reducción de los cationes se admite que hay un intercambio de los electrones por lo que probablemente sea lo mismo en la oxidación.

El número de electrones que intervienen en este proceso se puede determinar por coulombimetría.

V.C.3.D. ADICIONES DE FRAGMENTO SOBRE LA MT

Se han realizado adiciones de fragmento a una disolución de MT en $\text{TRIS} \cdot \text{HCl}$ $2.5 \cdot 10^{-3} \text{M}$ a pH 1.9 y 7.5 para estudiar las modificaciones que se observan.

En las figuras 157 y 158 se presentan los polarogramas superpuestos, realizados en las mismas condiciones, de fragmento, metalotioneína y fragmento+metalotioneína. En la misma figura se han indicado los potenciales de los picos atribuidos a las diferentes especies, tanto de metalotioneína como de fragmento en presencia de cadmio y zinc.

En el polarograma MT+F a pH 7.5, donde la concentración de fragmento es $C_F = 19 C_{MT}$, se puede observar que existen diferentes picos que se pueden atribuir, de potenciales mas positivos a negativos, 1° primer pico del fragmento, en presencia de cadmio o primer pico de la MT, 2° el primer pico del fragmento en presencia de zinc, el 3° al fragmento, el exceso que no ha reaccionado con metales, es decir que no ha sido capaz de desplazar a los metales de su enlace con la MT, el 4° al complejo Cd-F y el 5° al complejo Zn-F, todos ellos diferentes a Cd^{2+} y Zn^{2+} .

El esquema de los potenciales atribuidos a cada uno de los compuestos indicados se presenta en la figura 158.

Si se tienen en cuenta los valores de las constantes aparentes de formación de los complejos Cd y Zn, a pH 7.5, para MT y F se puede suponer que el equilibrio



está desplazado hacia la derecha y además favorecido por el exceso de concentración de fragmento con relación a MT. Los picos debidos a Cd-T y Zn-T, curva B, al añadir el fragmento a la

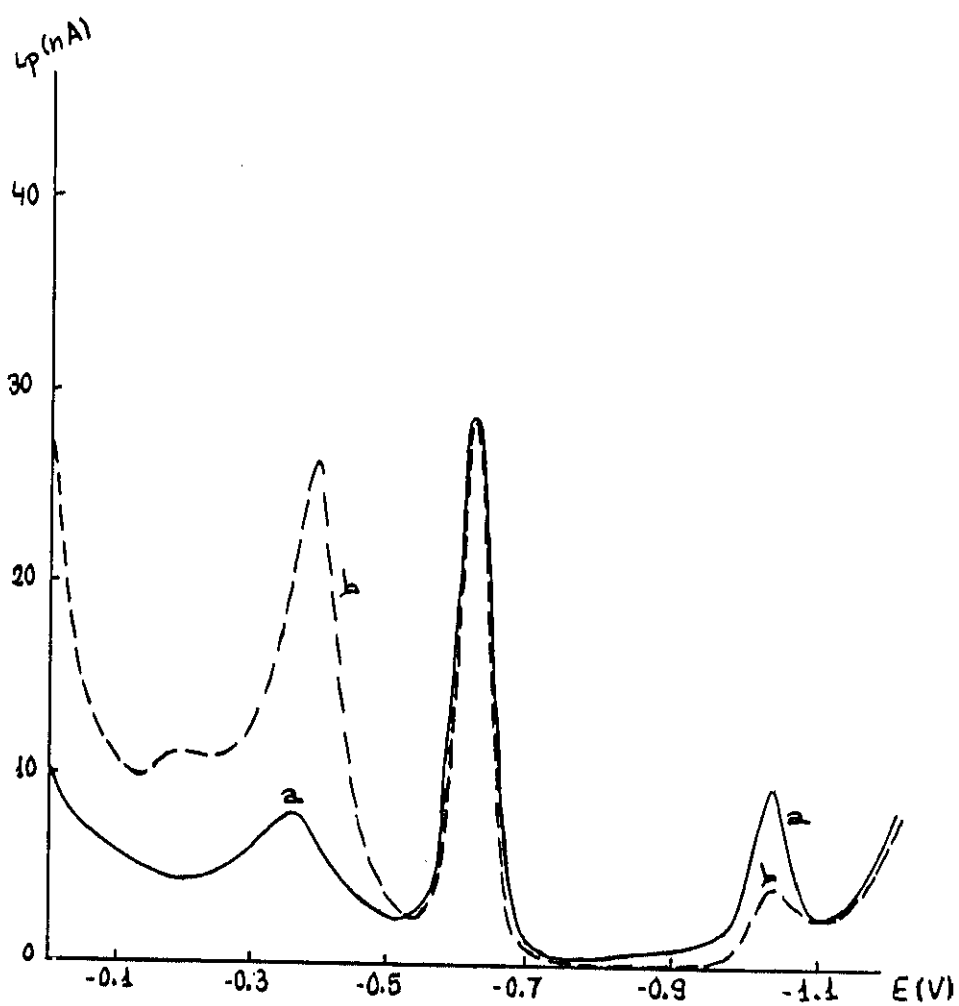


Fig. 157. D.P.P. de: (a) una disolución de MT $8.13 \cdot 10^{-7}$ M y (b) MT + $1.56 \cdot 10^{-3}$ M de fragmento en TRIS HCl $2.5 \cdot 10^{-2}$ M a pH 1.9

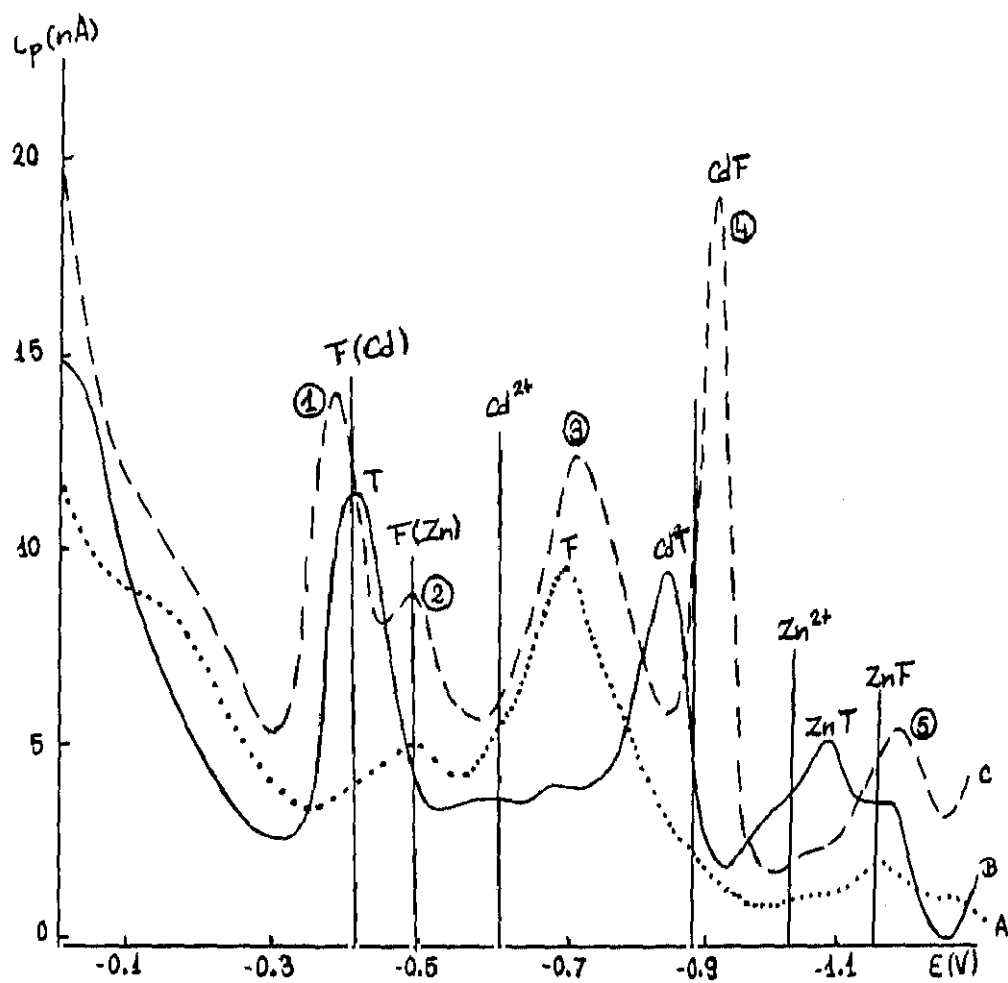


Fig. 158. D.P.P. de: (a) una disolución de MT $8.3 \cdot 10^{-7}$ M y (b) MT + $1.56 \cdot 10^{-5}$ M de fragmento en TRIS HCl $2.5 \cdot 10^{-2}$ M a pH 7.5

concentración indicada, desaparecen. Parece, por lo tanto, que el fragmento desplaza cuantitativamente los cationes inicialmente fijados a la MT. Es posible, así mismo, que existan complejos mixtos entre el metal, la MT y el fragmento, pero con los datos disponibles no es posible formular esta hipótesis.

El desplazamiento de los cationes de MT que se produce al adicionar el fragmento a una disolución de la MT y la consiguiente asociación MF, se ve favorecida ya que las constantes de formación son mayores para el fragmento que para la MT. Para que la reacción se produzca la MT debe disociarse, es decir, liberar los cationes. Si la estructura es la que se ha indicado, debe existir un impedimento estérico que impida el contacto entre la molécula de fragmento y los metales incluidos en la MT. Por lo tanto para que suceda el desplazamiento de los metales contenidos en la MT, ésta debe relajar su estructura.

Debe señalarse la existencia de $Ep(F_{zn})$ aunque en la disolución existe cadmio, probablemente debido a que el exceso grande de fragmento es capaz de formar $Cd-F$ y $Zn-F$ bien definidos e independientes.

A pH 1.8, el fenómeno polarográfico que se produce es mucho más sencillo, tal y como puede observarse en la figura 157. En ella se ven los picos correspondientes a los cationes Zn^{2+} y Cd^{2+} libres, que no se modifican por la adición del fragmento. El que sí se modifica como consecuencia de esta adición es el primer pico, pero sólo lo hace en intensidad, lo cual es lógico ya que hemos aumentado el número de grupos tiólicos de la disolución.

V.C.3.E. ESTUDIO EN FUNCION DE LA CONCENTRACION

Análogamente a como se ha hecho con la MT y la cisteína se ha determinado la altura del pico del fragmento en función de la concentración. El intervalo de concentraciones estudiado es de $1.59 \cdot 10^{-5}$ - $1.24 \cdot 10^{-4}$ M en medio TRIS·HCl $2.5 \cdot 10^{-2}$ M, empleado normalmente. Este estudio se ha realizado a pH 7.5 y 2.0.

La respuesta $i_p=f(c)$ se representa en la figura 159 para ambos pH. Se observa, en primer lugar, que la respuesta no es lineal para toda la gama de concentraciones estudiada, con una ruptura para una concentración entre 3 y $5 \cdot 10^{-5}$ M en los dos casos. Es decir, para concentraciones menores que las indicadas se puede asimilar a una recta y para mayores a otra con distinta pendiente. Esta forma de curvas se ha encontrado en la literatura (315) para otro tipo de compuestos que también presentan grupos tiólicos, y que solamente son lineales en cierto intervalo de concentraciones. Por otra parte, para la zona lineal el cambio de pH no ejerce influencia en la respuesta polarográfica ya que la pendiente para los dos pH estudiados es similar, lo que indica que el compuesto debe presentar la misma forma química.

En espectrofotometría UV, contrariamente a los resultados polarográficos, hemos obtenido rectas únicas para todo el intervalo de concentraciones estudiado.

Se pueden comparar las pendientes obtenidas para la MT, F y cisteína y, comparar con la relación del número de grupos SH existentes en las diferentes moléculas, los valores de ambas variables se representan en la siguiente tabla 41.

A partir de los valores indicados en la tabla se puede deducir que no existe ninguna relación entre el número de grupos tiólicos y la pendiente del pico atribuido a dichos grupos, por lo tanto, no se puede emplear como método de valoración de los compuestos orgánicos con grupos tiólicos en su molécula, sino que

Intensidad de pico en función la concentración de fragmento

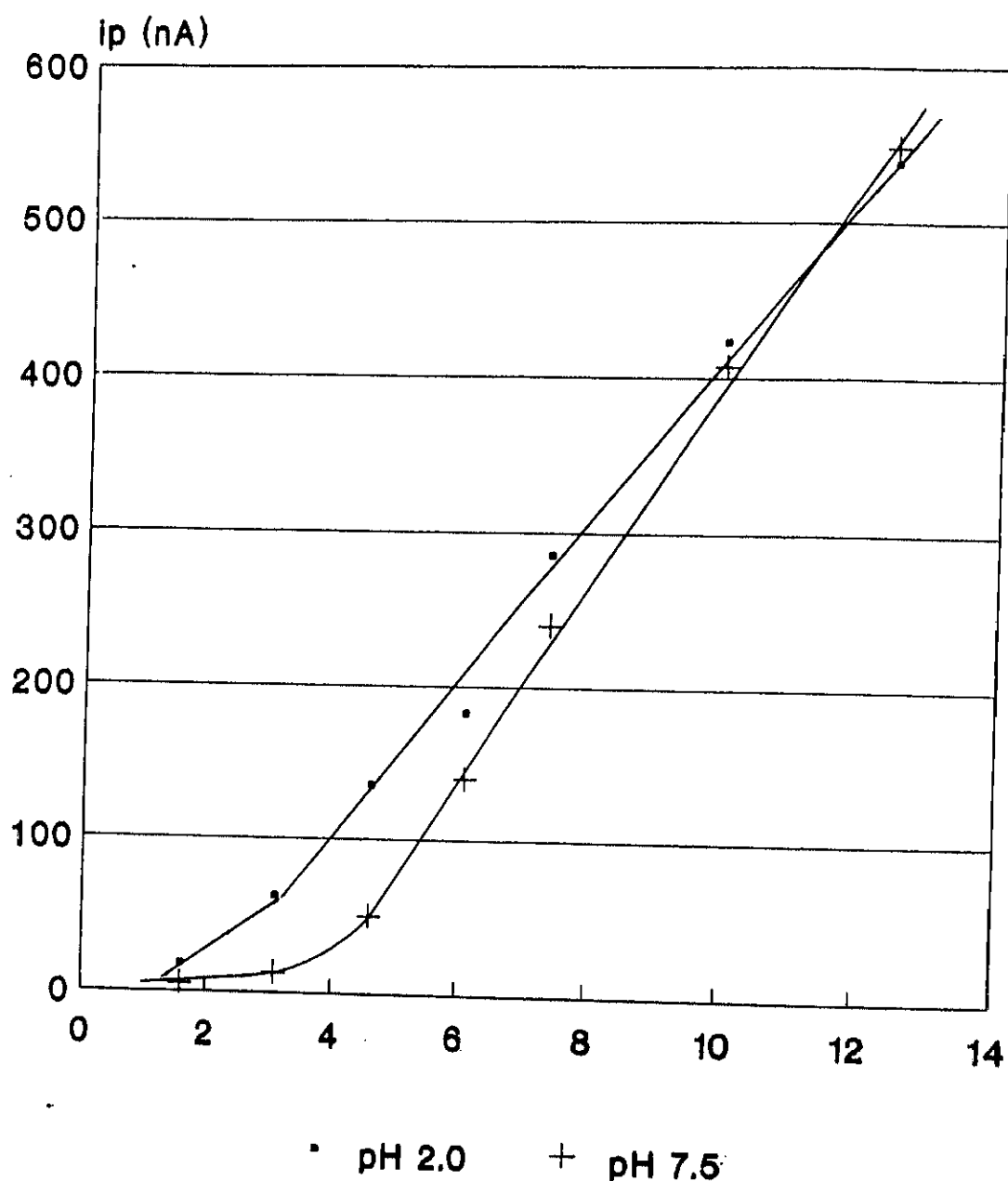


Fig. 159. Variación de la intensidad del pico, correspondiente a la oxidación del mercurio en presencia de cisteína, en función de la concentración para dos pHs diferentes: 7.5 y 2.0

depende de la naturaleza de la molécula. Y por tanto, para valorarlas debe realizarse una recta de calibrado para cada caso.

Tabla 41. Valores de la pendiente para el primer pico, a dos pH y, número de tioles de cada uno de los compuestos estudiados: MT, fragmento y cisteína.

M U E S T R A	b (pH)=7.5	b (pH)=2.0	nos ⁻
Cisteína	0.57 10 ⁶	10.40 10 ⁶	1
Fragmento	5.63 10 ⁶	4.86 10 ⁶	3
MT horse kidney lot.79F9670	1.64 10 ⁷	8.44 10 ⁷	20
MT horse kidney lot.28F9545	1.23 10 ⁷	8.44 10 ⁷	20
MT rabbit liver lot.20H9650	2.88 10 ⁷	12.34 10 ⁷	20
MT-I rabbit liver lot.129F9575	2.06 10 ⁷	-----	20
MT-II rabbit liver lot.79F9510	1.86 10 ⁷	-----	20
La pendiente de las MT es para $i_{01}=f(MT)$			

V.D. CONSIDERACIONES GENERALES

A lo largo de este capítulo se ha mencionado en repetidas ocasiones la ambigüedad existente con respecto al mecanismo electroquímico que rige la oxidación del electrodo de mercurio en presencia de un compuesto orgánico que contiene grupos tióles en su molécula. Aunque los razonamientos que se han realizado se basan en un intercambio de dos electrones no se descarta que $n=1$. En apoyo de esto último se encuentra el valor de la transformada logarítmica de las curvas intensidad-potencial de la cisteína, el fragmento y el primer pico de la metalotioneína (los dos primeros no mencionados en esta memoria). Además la presencia de cloruros en el electrolito soporte conlleva la formación del calomelano Hg_2Cl_2 que posiblemente se dismute en el electrodo. La pendiente de la relación $E=f(\text{pH})$ próxima al valor teórico de 0.058 V por unidad de pH no permite discriminar entre la formación de Hg(I) y Hg(II) ; lo único que se puede concluir es que el número de protones es igual al número de electrones intercambiados en el proceso electroquímico, $n=m$.

Se ha adoptado un mecanismo con dos electrones puesto que se conocen algunas de las constantes de formación con Hg(II) , pero no con Hg(I) . Con esta hipótesis se pueden dar valores indicativos de la constante de formación del complejo Hg(II)-F y comparar los potenciales, en presencia de cisteína, calculados a partir del valor de la constante Hg(II)-cys y experimental. No se puede dar un valor de la constante HgT puesto que no se ha dispuesto de la apotioneína.

En cualquiera de los casos, en las condiciones que se han empleado en nuestra experimentación con concentraciones de compuestos orgánicos menores de 10^{-4} molar y con un electrodo de goteo pensamos que el mecanismo propuesto por Bard y admitido en la mayor parte de trabajos electroquímicos basado en fenómenos de adsorción en el electrodo no es adecuado. Seguramente ese mecanismo sea válido en el caso de que se emplee una gota de

mercurio pendiente en la cual los fenómenos de adsorción pueden ser preponderantes. Esto se ilustra con las pocas experiencias realizadas en polarografía de redisolución anódica, en particular la variación de la intensidad de los picos de las metalotioneínas en función del tiempo de depósito. La constancia en la respuesta indica, probablemente, que la superficie de la gota se encuentra saturada.

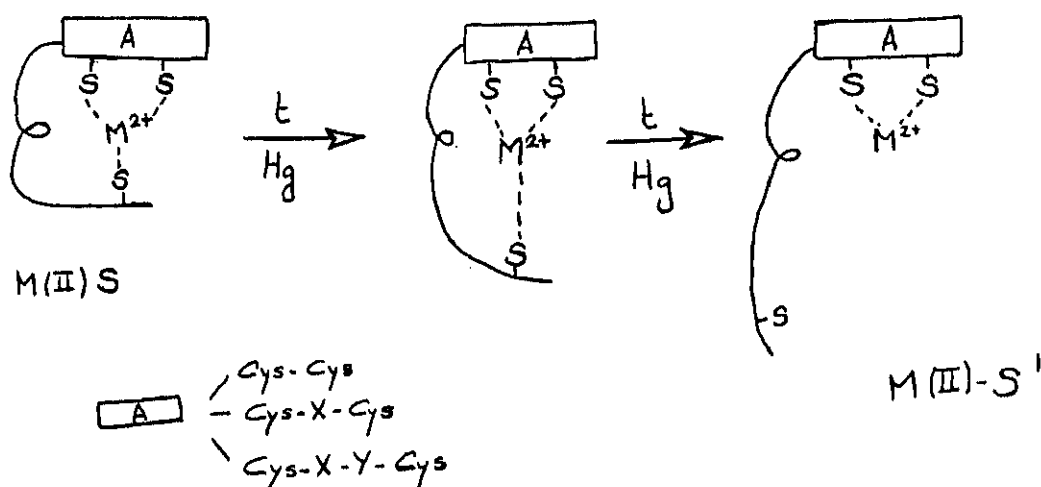
Con respecto al comportamiento polarográfico, en general, del fragmento y de la metalotioneína se encuentran analogías remarcables. Sólo se puede comentar el caso del cadmio, ya que, como se ha mencionado repetidas veces, los picos correspondientes al zinc están próximos al dominio de electroactividad del electrolito. Cabe destacar la semejanza en la capacidad de formación de complejos del fragmento y de la tioneína con el cadmio. Los dos compuestos forman dos complejos diferentes, denominados en esta memoria Cd-T, Cd-F, Cd-T' y Cd-F', con constantes de estabilidad análogas. Además, es probable que la estequiometría de ambos, con tioneína o con fragmento sea similar (Relación de pendientes $\log (CdT, CdT') = f(pH)$ igual a tres en el caso de la metalotioneína, $i_{p_{CdF}} = 3i_{p_{CdF'}}$ en el caso del fragmento). Los resultados obtenidos hasta la fecha nos permiten solamente hacer un cierto número de consideraciones, pero no de manera concluyente.

Seguramente en este tipo de complejos sea muy importante tener en cuenta la estructura de los diferentes compuestos. Lo señalado tiene en cuenta solamente consideraciones analíticas pero no bioquímicas.

Desde el punto de vista estructural podemos realizar las siguientes hipótesis. La MT presenta una estructura molecular compleja, formando "clusters" en los que se encuentran los metales incluidos y unidos, cada uno de ellos, a tres azúfres a través de enlaces tiólicos y estabilizados por restos aminos de aminoácidos básicos situados en posiciones adyacentes. En disolución, después de cierto tiempo o cuando existe un exceso

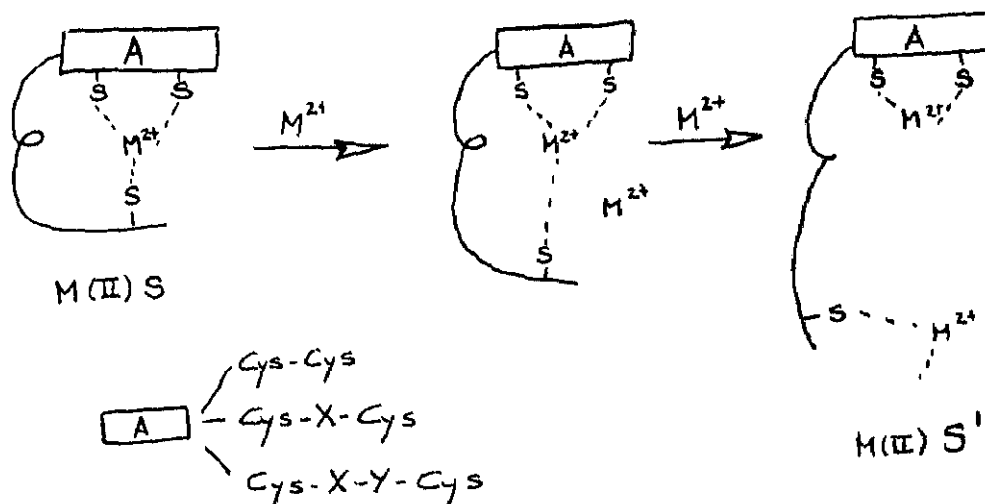
de cationes en disolución se produce una relajación de los enlaces con la consecuente apertura de la molécula. Por eso existen dos tipos de complejos, que se observan claramente en el caso del cadmio, el primero Cd-T, que aparece en la MT nativa recién preparada y, en el que cada uno de los cationes cadmio incluidos en los dos "clusters" están asociados con tres grupos tiólicos pertenecientes a otras tantas cisteínas. Además, estos "clusters" se ven estabilizados por los restos amino de los aminoácidos básicos situados en posiciones adyacentes a las cisteínas.

Con el tiempo sufre una relajación de la estructura cuaternaria, que podría explicarse como una apertura de los "clusters", que hace que el tercer residuo de cisteína, el que está mas alejado, no pueda asociarse al catión, o si lo hace es de manera mucho más débil. Esto hace que este complejo sea mucho más debil y por lo tanto aparezca a un potencial menos negativo. Además explica que a pesar de ser más débil sea el que se ve favorecido con el tiempo.



Este segundo complejo es al que hemos denominado, Cd-T', que se ve favorecido con el tiempo en detrimento del primero, Cd-T. Otro hecho a destacar es que quedarían, por lo tanto, grupos tiólicos libres que podrían ligarse a más cationes. Esto explicaría los datos de la literatura que indican que ciertos cationes bivalentes (Co^{2+} , Hg^{2+}) aunque saturan a la MT con siete

átomos-gramo, pueden llegar a asociarse en número de doce y; ciertos monovalentes, Ag^+ , aunque la saturan con doce átomos-gramo pueden llegar a asociarse en número de veinte. De manera similar ocurriría con las adiciones de cationes metálicos en exceso, aunque la saturación se produjese, un exceso de metal podría ser acoplado produciendo un fenómeno análogo al anterior. Esto explicaría el que a simple vista la adición de cationes a las MT parece generar un balance de materia positivo.



Por otro lado, parece probable que, tanto la metalotioneína como la apotioneína presentan una estructura espacial diferente. En su estado asociado a cationes metálicos se encuentra plegada formando una estructura ovalada con los grupos tiólicos orientados hacia el interior; sin embargo la apotioneína o la metalotioneína protonada a pHs muy ácidos, debe presentar una estructura mucho más abierta casi lineal con los grupos funcionales hacia el exterior.

La diferente disposición espacial hace que la interacción con la superficie del electrodo sea diferente, no sólo por el tamaño de la molécula que puede modificar la difusión, sino también, por la diferente accesibilidad de los grupos funcionales activos en electroquímica, los grupos tiólicos.

Por otro lado, se realizaron estudios cuantitativos. Se podía esperar encontrar ciertas relaciones entre la respuesta

polarográfica, i_p , para cada uno de los picos estudiados en función de la concentración inicial del compuesto en disolución. Pero se encontró una recta única para la intensidad de señal en función del contenido total de grupos tiólicos asociados a cationes, pero considerando que estas moléculas no se encuentran saturadas y, se propone como método de valoración.

Cuando se interpola en la recta logarítmica de calibración propuesta por Olafson and Sim (339), respuesta polarográfica en función del peso molecular, $i_p=f(PM)$, obtenemos valores concordantes, no dispersos. (Fig. 160).

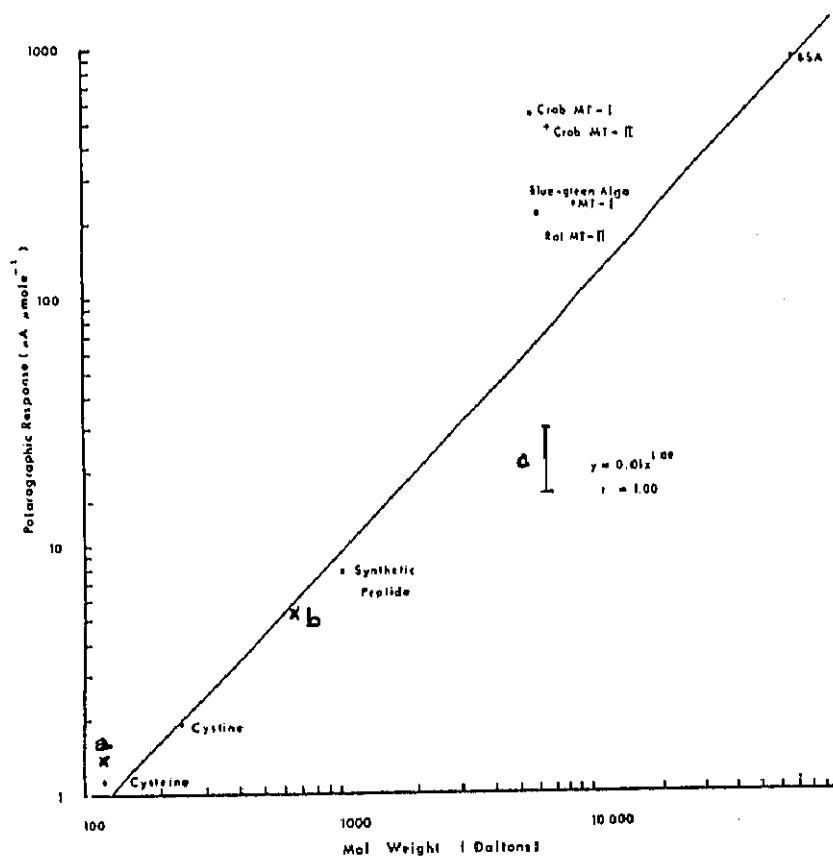


Fig. 160. Relación entre la respuesta polarográfica y el peso molecular de los compuestos tiólicos (Thompson & Cosson, 1984). Sobre la que se han representado, los valores que hemos obtenido para: (a) cisteína, (b) fragmento terminal 56-61 de MT-I y (c) el intervalo en el que se incluyen las cinco metalotioneínas estudiadas.

VI. CONCLUSIONES

IV. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones que se pueden obtener del conjunto de resultados expuestos se presentan de acuerdo con la estructura de la memoria.

DETERMINACION DEL CONTENIDO METALICO DE LAS METALOTIONEINAS

La determinación del contenido metálico de las cinco metalotioneínas utilizadas se ha efectuado por dos técnicas, la espectrometría de absorción atómica en horno de grafito, que nos proporciona el valor de la concentración total de cada uno de los elementos existentes y, la polarografía de impulsos diferencial a $\text{pH}=2.0$.

Los resultados obtenidos por ambos métodos analíticos están en buena concordancia y son próximos de los que se indicados por la casa comercial. El hecho de que la concentración de cationes metálicos, cadmio y zinc, obtenida por polarografía de impulso diferencial a $\text{pH } 2.0$ sean próximos a los obtenidos por espectroscopía de absorción atómica, indican que a este valor de pH los cationes se encuentran totalmente libres de su unión con la metalotioneína.

ESTUDIO ESPECTROFOTOMETRICO DE LA CISTEINA, EL FRAGMENTO 56-61 DE LA MT-I Y LAS METALOTIONEINAS

El estudio espectrofotométrico, realizado en función de los diferentes parámetros que rigen el proceso, permite obtener información sobre el comportamiento de dichas moléculas en función del pH de la disolución, las interacciones con los cationes metálicos añadidos, así como la utilización de la espectrofotometría UV como método analítico para la determinación cuantitativa de este tipo de compuestos.

De manera general, cabe indicar que la absorbancia a las diferentes longitudes de onda características corresponde a la contribución de los diferentes grupos funcionales y enlaces que constituyen las respectivas moléculas estudiadas. Se puede diferenciar claramente dos zonas de absorción características a todos los compuestos estudiados. Una banda de absorción aguda que aparece a una longitud próxima a los 200 nm, que se atribuye a la parte orgánica de la molécula y que es debida a la contribución de los grupos amida primarios y secundarios, tiólicos libres, carboxílicos y, en menor medida, los hidróxidos. Una banda de absorción ancha comprendida entre 225-255 nm que corresponde a los enlaces metal-tiolato. La longitud de onda a la que esta banda aparece depende de la naturaleza del metal.

- Influencia del medio

Se han empleado dos medios amortiguadores de pH: fosfato y TRIS, éste último a dos concentraciones diferentes. El medio empleado tiene influencia en el intervalo de longitudes de onda que corresponden a la absorción de la parte orgánica, $\lambda=200$ nm. Se observa que la señal está exaltada en medio TRIS con respecto al fosfato. Por otra parte, para una mayor concentración de TRIS se obtiene una menor señal de absorbancia.

CISTEINA

- Influencia del pH

La variación del espectro de absorción de la cisteína en función del pH muestra, para los dos medios estudiados, una evolución similar, un desplazamiento batocrómico a medida que el pH aumenta. Estas variaciones de absorbancia, a una longitud de onda dada, en función del pH permite evaluar, de manera aproximada las constantes aparentes de disociación ácido-base. Los valores de pK_a obtenidos fueron aproximadamente, 8.5 y 9.5 en

medio TRIS y fosfato, respectivamente. Estos valores están en concordancia con lo que se encuentra en la literatura, $pK_a=9.0$.

- Adición de cationes metálicos.

La adición de cationes metálicos, cadmio y/o zinc modifica apreciablemente el espectro de absorción de la cisteína. Lo más significativo es la aparición de un hombro a longitudes de onda superiores a aquella a la que aparece el máximo de absorción, característico de los enlaces metal-tiolato.

La variación del espectro en función de las adiciones sucesivas de catión metálico muestra un punto isosbético, lo que indica un equilibrio entre diferentes especies en disolución, cisteína libre y cisteína como ligando de cadmio o zinc.

FRAGMENTO 56-61 DE LA MT-I.

Que nosotros conozcamos, es el primer estudio sistemático, por espectrofotometría, del fragmento 56-61 de la MT-I, en función de diferentes parámetros.

- Influencia del pH

Los espectros del fragmento, realizados en un amplio intervalo de pH, 1.5 a 12.0 y en medios diferentes, TRIS y fosfato, presentan una morfología y una variación parecida a la descrita precedentemente para el caso de la cisteína. Análogamente, se observa un desplazamiento batocrómico a medida que el pH de la disolución aumenta.

Los valores de las constantes de disociación ácido-base evaluadas de las curvas $A=f(pH)$ a una longitud de onda dada son 8.5 y 9.5 en medio TRIS y fosfato, respectivamente. Los mismos

datos han sido refinados en un programa de cálculo (Universidad Autónoma de Barcelona, Dpto. Química Analítica) y se han obtenido $pK_a=8.9$ en TRIS y $pK_a=9.40$ en fosfato. Estos valores de pK_a son característicos de la disociación de protones unidos a grupos tiólicos.

- Adición de cationes metálicos

De los cationes considerados, cadmio y zinc, nuestro estudio es más completo para el Cd-fragmento.

Cualitativamente la adición de cadmio y/o zinc provoca el desplazamiento del pico de su posición inicial, aproximadamente 200 nm, hacia longitudes de onda más elevadas. Por otra parte, aparece un hombro de absorción a longitudes de onda comprendidas entre 225 y 255 nm atribuido, como en el caso de la cisteína a la contribución de los enlaces metal-tiolato.

Con respecto a la complejación cadmio-fragmento se ha aplicado el método de las variaciones continuas con el fin de obtener información sobre la estequiometría del complejo cadmio-fragmento. Sin embargo, la utilización de este método no permite obtener conclusiones definitivas. En efecto, aparentemente, tanto en medio fosfato como en TRIS, si se admite un complejo único, éste debería tener una estequiometría 2:3, Cd_2F_3 , pero de la forma de la curva, en medio TRIS, se puede deducir que la coexistencia de dos complejos diferentes será lo más probable. Esta hipótesis se ha confirmado con el estudio polarográfico.

Del estudio realizado del fragmento en presencia de cadmio en función del pH se puede comprobar que para pH inferiores a 4.5 no tiene lugar el fenómeno de complejación cadmio-fragmento y el cadmio se encuentra como catión libre en disolución. Por el contrario para pH >7 el complejo cadmio-fragmento está totalmente formado.

Para el caso del zinc es difícil sacar conclusiones a partir de nuestros resultados. Se puede decir, sin embargo que, para los dos cationes cadmio y zinc se llega a una saturación del fragmento por complejación, puesto que la absorción en el hombro atribuido a los enlaces metal-fragmento permanece constante a partir de una relación de Metal/Fragmento dada. Esta relación parece diferente para el cadmio y para el zinc.

METALOTIONEINAS

El espectro de las metalotioneínas presenta un morfología análoga, ya descrita, al fragmento o a la cisteína en presencia de cationes metálicos.

La medida espectrofotométrica de una disolución de metalotioneína en función del tiempo indica que esta proteína es estable y que aparentemente, no existe una disociación de los cationes metálicos bien unidos al conjunto orgánico.

- Influencia del pH

El pico atribuido a la parte orgánica de la molécula experimenta un desplazamiento hacia longitudes de onda mayores a medida que aumenta el pH, análogamente a lo ya indicado.

Lo más significativo es la desaparición del hombro de absorción, situado a longitudes de onda entre 225 y 255 nm, a pH ácidos ya que se rompen las uniones metal-tiolato. Se puede indicar que para pH menores a 4.0 los cationes se encuentran completamente disociados y, que probablemente la apometalotioneína presenta una forma protonada.

Los ensayos realizados con respecto a la reversibilidad del equilibrio de complejación de los cationes metálicos con la tioneína cuando se pasa de pHs básicos a ácidos y viceversa

permiten indicar que, probablemente el sistema sea reversible y que la metalotioneína se reconstituye cuando el pH de la disolución aumenta, pero que su estructura sea diferente de la inicial.

- Adiciones de cationes metálicos

La adición de cadmio a la metalotioneína origina un aumento de la señal de absorbancia en el hombro, de tal manera que aparentemente la metalotioneína saturada es capaz de fijar más cadmio. Este método no es lo suficientemente sensible para deducir un posible cambio de estructura en la molécula.

- Influencia de la concentración sobre la absorbancia. Cisteína, fragmento y metalotioneínas de diferente origen.

La respuesta de la absorbancia como una función de la concentración, para los diferentes compuestos analizados, es lineal para el intervalo de concentraciones estudiado.

Los coeficientes de absortividad molar dependen de la naturaleza de la sustancia. Para la longitud de onda correspondiente al máximo de cada compuesto, en unas condiciones experimentales determinadas la secuencia es la siguiente:

$$\xi_{\text{máx}}(\text{MT}) > \xi_{\text{máx}}(\text{F}) > \xi_{\text{máx}}(\text{cys})$$

La respuesta $A=f(c)$ para las cinco metalotioneínas estudiadas en el máximo es independiente del origen de las metalotioneínas por lo que se obtiene una recta única representativa de la concentración. Los valores de $\xi_{\text{máx}}$ oscilan entre 2.9 y $3.8 \cdot 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ por lo que se puede proponer este método como método de determinación del contenido de metalotioneínas, en un medio dado, independientemente del origen de las metalotioneínas y del contenido metálico de las mismas.

Sería necesario disponer de otro tipo de metalotioneínas sintetizadas y caracterizadas de diferente procedencia para poder concluir de manera más general, pero los datos obtenidos se orientan en esa dirección.

La medida de la absorbancia, en la zona correspondiente al máximo, en función de la concentración de metalotioneínas o del contenido metálico de las mismas es también lineal y parece no depender ni de la naturaleza del medio empleado, ni de la concentración, ni tampoco del pH de la disolución para pH básicos. Sin embargo, la variación lineal de la absorbancia, en la banda de absorción próxima a 250 nm, en función de la concentración total de cationes para las cinco metalotioneínas estudiadas, con contenido metálico total muy diferente, no es única. La respuesta es la suma de las contribuciones de los cadmio-tiolatos y los zinc-tiolatos con máximo de absorción a diferentes longitudes de onda para cada uno de los dos cationes y que no se puede diferenciar, por este método, para una (Cd,Zn)-metalotioneína utilizada.

La no discriminación de absorbancia debida a CdT y ZnT en el hombro de absorción se puede paliar si se aplica un método de análisis de multicomponentes, válido para la determinación de compuestos que poseen espectros de absorción no resueltos.

Proponemos la absorbancia en la zona del máximo, próxima a los 200 nm como método de valoración. Las características analíticas del método son las que se indican en la siguiente tabla.

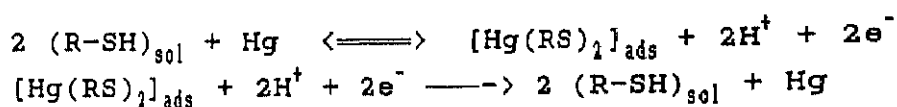
Podemos decir que la espectrofotometría de absorción molecular U.V. es método simple y fácilmente accesible, que nos permite obtener una rápida información sobre las características del compuesto que analizamos, nos proporciona una idea sobre la naturaleza del compuesto, es decir, el tamaño molecular de la cadena y presencia o no de cationes metálicos complejados con los grupos funcionales de la misma.

Características analíticas del método de valoración para los compuestos estudiados: cisteína, fragmento terminal 56-61 y metalotioneínas.

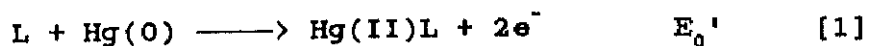
MUESTRA ESTUDIADA	CARACTERISTICAS DEL METODO ANALITICO DE VALORACION
CISTEINA	<p>Intervalo de linealidad: $0.8 \cdot 10^{-4} - 8.1 \cdot 10^{-4} \text{ M}$</p> <p>Ecuación de la recta: $y = 3.36 \cdot 10^{-3} + 8.31 \cdot 10^1 x$</p> <p>Coefficiente de variación: ± 0.2258 2.7 %</p> <p>Límite de detección: $0.271 \cdot 10^{-4} \text{ M}$</p>
FRAGMENTO TERMINAL 56-61	<p>Intervalo de linealidad: $2.32 \cdot 10^{-5} - 8.53 \cdot 10^{-5} \text{ M}$</p> <p>Ecuación de la recta: $y = 0.216 \cdot 10^{-5} + 1.8 \cdot 10^4 x$</p> <p>Coefficiente de variación: ± 0.335 18%</p> <p>Límite de detección: $1.878 \cdot 10^{-5} \text{ M}$</p>
METALOTIONEINA	<p>Intervalo de linealidad: $3.5 \cdot 10^{-7} - 1.72 \cdot 10^{-5} \text{ M}$</p> <p>Ecuación de la recta: $y = 7.9 \cdot 10^{-4} + 3.2 \cdot 10^5 x$</p> <p>Coefficiente de variación: ± 0.098 7.6%</p> <p>Límite de detección: $3.01 \cdot 10^{-7} \text{ M}$</p>

ESTUDIO ELECTROQUIMICO DE LAS METALOTIONEINAS, LA CISTEINA Y EL FRAGMENTO TERMINAL 56-61

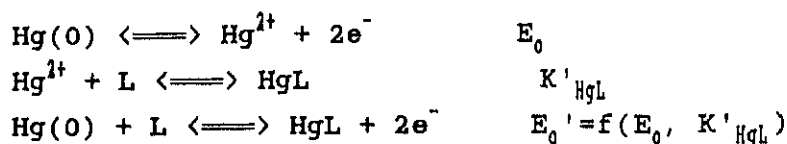
El mecanismo electroquímico propuesto en publicaciones anteriores a este trabajo para las sustancias orgánicas con grupos tiólicos en la molécula comprende una etapa de adsorción en el electrodo con formación de mercurio-tiolatos y una posterior reducción del producto adsorbido. El mecanismo propuesto por Bard se puede esquematizar de la siguiente manera:



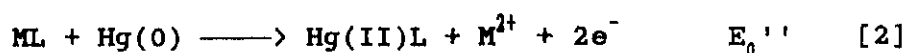
En este tipo de mecanismo, regido por la adsorción en el electrodo, la concentración de la sustancia que se estudia desempeña un papel fundamental. En las condiciones experimentales en las que se ha realizado el presente trabajo, que se indican en la memoria, con unas concentraciones del orden de 10^{-6} M y en un electrodo de gotas de mercurio, consideramos que la etapa de adsorción no es la determinante y se propone un mecanismo regido por la difusión estacionaria, que conlleva la oxidación del mercurio, en presencia de una sustancia complejante. La formación de tiolato de mercurio es la base del proceso independientemente de que quede o no adsorbido en la gota. Así, si designamos por L al compuesto orgánico con grupos tiólicos que, en nuestro caso, puede representar a la cisteína, al fragmento terminal 56-61 de la MT-I o a la apotioneína, parte orgánica de la metalotioneína, el esquema sería el siguiente:



En este caso el potencial al que aparece el pico o la onda de oxidación, E_0' , es una función del potencial de oxidación del mercurio $Hg(0)/Hg(II)$, E_0 , en ausencia de complejante y de la constante condicional de formación del equilibrio de complejación, en un medio dado y en unas condiciones determinadas,



En el caso que el ligando se encuentre unido a un catión metálico diferente del mercurio, el proceso electroquímico sería:



y estaría caracterizado por un potencial E_0'' , que dependería de los dos factores mencionados anteriormente y de la constante de formación del equilibrio $\text{M}^{2+} + \text{L} \rightleftharpoons \text{ML}$, K'_{ML} . Así $E_0'' = f(E_0, K'_{\text{HgL}}, K'_{\text{ML}})$.

Se ha admitido, a lo largo de toda la discursión de resultados que se presenta que el grado de oxidación del mercurio en el producto formado por la reacción electroquímica es (II), sin descartar, que pueda ser prioritaria la oxidación a grado de oxidación (I), en particular en el medio empleado con una concentración importante de iones cloruro.

CISTEINA:

De los ensayos realizados con cisteína, unidad fundamental que rige el proceso y contenida, tanto en el fragmento como en la metalotioneína, se puede, por una parte, comprobar el mecanismo propuesto y, por otra, comparar su comportamiento con el que presenta la metalotioneína.

Como la constante de formación del complejo cisteína-Hg(II) es conocida se puede calcular E_0' de la oxidación del mercurio en presencia de cisteína. Los valores calculados y experimentales son parecidos:

$$E_0'(\text{exp}) = -0.430\text{V}$$

$$E_0'(\text{calc}) = -0.486\text{V}$$

en TRIS pH=7.5.

- El potencial de la cisteína a pH=2 es parecido al del primer pico de la metalotioneína, $E_{p_1}(MT)$.

FRAGMENTO:

- Estudios en función del pH, $f(pH)$

- El comportamiento de la respuesta polarográfica debida al fragmento en función del pH es típica de una sustancia con propiedades ácido-base. El potencial de pico se desplaza hacia potenciales más negativos a medida que el pH de la disolución aumenta. Del valor de la pendiente de la recta, $E_{p_f}=f(pH)$, 0.052V por unidad de pH próximo al valor teórico, 0.058, se deduce que, en el mecanismo electroquímico, el número de protones que intervienen en el proceso es igual al número de electrones, $n=m$.

- De la diferencia de potencial entre la oxidación del mercurio en ausencia de complejante y el potencial en presencia del fragmento se puede evaluar la constante de complejación condicional del equilibrio $Hg(II)$ más fragmento si se admite $n=2$. Este valor es (según [1]):

$$\log K'(HgF) = 28.3 \quad pH \ 8.90$$

- Adiciones de cadmio y/o zinc.

La adición de un catión metálico cadmio o zinc, que puede formar complejos con el fragmento, a una disolución que contiene el fragmento provoca el desdoblamiento del único pico polarográfico obtenido con el fragmento solo, E_{p_f} , en dos picos perfectamente definidos. Uno hacia potenciales más negativos

atribuido a la reducción del catión metálico en presencia de un complejante, E_{pF}



diferente al potencial de pico de reducción del catión libre en disolución $M^{2+} + 2e^- \rightleftharpoons M(Hg)$, $E_p(M^{2+})$. Otro pico desplazado hacia potenciales más positivos con respecto a E_{pF} que se atribuye a la oxidación del mercurio en presencia del complejo catión metálico-fragmento (reacción [2]) y cuyo potencial $E_{pF(N)}$ depende de la relación de constantes de complejación, K'_{HgF} y K'_{MF} .

La diferencia de potencial entre esos dos picos y el inicial del fragmento depende de la naturaleza del catión metálico y del medio, en particular del pH de la disolución. Sin embargo, para un medio dado esta diferencia de potencial $E_{pF(N)} - E_{pF}$ es igual a la diferencia de potencial entre el pico del catión metálico complejoado y del metal libre:

$$\begin{aligned} [E_{pF(Cd)} - E_{pF}]_{ox} &= [E_{pCdF} - E_{pCd^{2+}}]_{red} \\ [E_{pF(Cd)} - E_{pF}]_{ox} &= [E_{pCdF} - E_{pCd^{2+}}]_{red} \end{aligned}$$

para un medio dado.

Así mismo, se constata que la morfología de los picos en presencia de cadmio o zinc cambia con respecto a la del fragmento sólo, lo que implica una modificación en el proceso electroquímico en la superficie del electrodo. Los picos obtenidos en presencia de catión metálico son más agudos, más simétricos y mejor definidos, lo que parece indicar que se deben a un sistema rápido electroquímicamente reversible.

- Se ha detectado la existencia de dos complejos cadmio-fragmento de estabilidad diferente, denominados Cd-F y Cd-F'. El complejo Cd-F es más estable que el complejo Cd-F'. La estequiometría de estos complejos no se ha podido determinar de manera concluyente;

se puede indicar que probablemente la relación entre Cd:F en el complejo global, compuesto por la suma de Cd-F y Cd-F' sea de 1:1

Se han determinado las constantes de formación condicionales de ambos complejos, Cd-F y Cd-F', a diferentes pHs y en los medios estudiados, borato y TRIS HCl. Así mismo se ha evaluado la constante de complejación del Zn-F. Como se ha indicado, $K'(\text{CdF}) > K'(\text{ZnF})$ para los pHs estudiados.

Se ha comprobado como el pH de no formación del complejo Cd-F es menor que el del complejo Zn-F y que para $\text{pH} < 3.5$ no se produce la formación de dichos enlaces metal-tiolato.

Parece probable que la diferente naturaleza de los complejos existentes se deba a problemas estructurales.

- Estabilidad del complejo. Se ha comprobado que el complejo (Cd,Zn)F es estable en función del tiempo transcurrido, desde su preparación, cuatro días.

METALOTIONEINAS

- Influencia del pH

- Se ha estudiado el comportamiento electroquímico de las (Cd,Zn)metalotioneínas en función del pH de la disolución. El polarograma obtenido, para un pH=7.5 muestra tres picos bien definidos cuyos potenciales, $E_{p_1}(MT)=-0.38$ V, $E_{p_2}(MT)=-0.80$ V y $E_{p_3}(MT)=-1.14$ V son diferentes de los potenciales de los cationes libres, Cd^{2+} y Zn^{2+} , obtenidos en las mismas condiciones y que son $E_{p_{Cd^{2+}}}=-0.58$ V y $E_{p_{Zn^{2+}}}=-0.98$ V. El primer pico se ha atribuido a la oxidación del mercurio del electrodo en presencia de los grupos tiólicos de la metalotioneína contenidos en la parte orgánica y asociados a los cationes cadmio y zinc [2]. El segundo y el tercer picos a la reducción, en el electrodo de mercurio, de los cationes cadmio y zinc, respectivamente, asociados a la tioneína. $E_{p_1}(MT)=E_p(CdT)$ y $E_{p_3}(MT)=E_p(ZnT)$.

- Las cinco metalotioneínas estudiadas, de diferente procedencia, con estructuras que contienen distintas isoformas y con contenido metálico también diferente, presentan el mismo comportamiento y se obtienen polarogramas con morfología análoga.

- Cuando se varía el pH entre 1 y 10.5 se observan fenómenos de desplazamiento, aparición y desaparición de los diferentes picos. De la variación de los diferentes potenciales $E_{p(MT)}=f(pH)$ y del valor de las pendientes se deduce que en la reducción de los cationes metálicos complejados por la tioneína, el número de electrones implicados en el proceso electroquímico es igual al número de protones que intervienen en la reacción. Como en este caso observamos experimentalmente que $n=2$ se puede admitir que intervienen dos protones. Por otra parte se evalúa el pK_a' de la metalotioneína. El valor encontrado de $pK_a'=3.8$ es próximo al obtenido por el método espectrofotométrico y concuerda con el que se encuentra en la literatura, obtenido mediante N.M.R.

A pH ácido se obtiene el primer pico cuyo potencial, $E_{p1}(MT)$, se desplaza hacia valores menos negativos y los picos correspondientes a los cationes libres, completamente disociados de su unión con la metalotioneína. Cualitativamente se deduce que el complejo Zn-T es menos estable que el Cd-T ya que el pH para el cual se rompe el complejo y se obtienen cada uno de los cationes libres es diferente, siendo mayor, $pH \approx 5.5$, para el zinc que para el cadmio, $pH \approx 4$.

- Los valores de las constantes de asociación condicionales entre la metalotioneína y el cadmio y el zinc para las cinco metalotioneínas estudiadas y la variación de una de ellas, $MT(I+II)$ r.l., con respecto al pH se determinaron a partir de las diferencias entre el potencial de los cationes libres y de los cationes asociados. Se confirma cuantitativamente que, para todos los pHs, el complejo de cadmio es más estable que el correspondiente complejo de zinc. Las pendientes $\log K_{MT}' = f(pH)$ son diferentes para ambos cationes lo que indica que probablemente se formen complejos de naturaleza diferente.

- La variación de $i_{p(MT)} = f(pH)$ permite indicar que para $pH > 4$ y $pH < 4$, las especies que difunden de la disolución a la superficie del electrodo presentan características diferentes. En el caso de la reducción de los cationes, éstos se identifican como cationes libres y disociados para $pH < 4$. Para la parte orgánica de la metalotioneína es más difícil encontrar una explicación válida.

- Los estudios fundamentales del proceso en el electrodo para determinar el número de electrones, n y el coeficiente de difusión, D , a diferentes pHs no permiten sacar conclusiones definitivas. Sólo podemos indicar que el número de electrones para el primer pico es próximo a 1, a los dos pHs 2.0 y 7.5, y que para el segundo pico es 1 a pH 7.5 y igual a 2 a pH ácido, ya que en este último caso la especie existente en disolución es el catión cadmio libre. El coeficiente de difusión para el primer pico es aproximadamente igual a los dos pH estudiados lo que

indica que es la misma especie la que difunde, mientras que para el segundo pico es de diferente magnitud y por lo tanto serian dos especies químicas diferentes las que difunden.

- Estabilidad de la metalotioneína.

- La respuesta polarográfica de la metalotioneína evoluciona en función del tiempo, en particular en presencia de una capa de mercurio en la disolución, que puede originar fenómenos de adsorción de esta molécula en su superficie.

El pico correspondiente al complejo Cd-T se desdobra y aparece otro pico que se ha atribuido a otro complejo del cadmio con la tioneína, denominado Cd-T'. Este segundo complejo, termodinámicamente menos estable que el denominado Cd-T, parece ser más estable cinéticamente que el primero. El complejo Cd-T presenta una unión más fuerte, pero menos estable en función del tiempo.

- Estudios realizados por técnicas de redisolución anódica, con un electrodo fijo de gota pendiente confirman la hipótesis enunciada con respecto a la formación de dos complejos Cd-T diferentes. En redisolución el complejo que se forma prioritariamente durante la oxidación del cadmio, previamente amalgamado en el electrodo, es el complejo Cd-T'.

- En las condiciones de redisolución anódica, con gota pendiente de mercurio y tras un contacto prolongado de dicha gota con las especies en disolución, es probable que los fenómenos de adsorción en el electrodo sean los preponderantes y que rijan el proceso electroquímico.

- Adiciones de cationes metálicos.

La adición de cationes metálicos, cadmio o zinc provoca el desdoblamiento y la evolución de los picos polarográficos.

La adición de zinc a una disolución que contiene metalotioneína ocasiona, al contrario de lo que se podría prever termodinámicamente según los valores de las constantes de formación Cd-T y Zn-T, el desplazamiento del cadmio del complejo Cd-T y la aparición del complejo Cd-T', menos fuerte. Podría ser debido a que las concentraciones de cationes metálicos no sean lo suficientemente elevadas para provocar el desplazamiento de un catión por otro. Los fenómenos son más acusados a pHs básicos, ya que las constantes de asociación son mayores. Se ha comprobado como a pH=4 sólo el catión cadmio permanece complejoado, mientras que el zinc existente en la metalotioneína ha pasado a la disolución.

Se deduce, así mismo, el valor de las constantes de asociación del complejo Cd-T' a diferentes pHs. Se comprueba que el valor de dicha constante es menor para el complejo Cd-T' que para el complejo Cd-T. Tal y como ocurría en el caso de los dos complejos cadmio-fragmento, existentes en disolución.

Que nosotros conozcamos, es la primera vez que se describe la existencia de dos complejos de naturaleza y de estabilidad diferente de cadmio-tioneína. Es probable que el zinc tenga un comportamiento análogo y que se formen también dos complejos de estructura diferente, pero nuestros resultados no nos permiten concluir en ese sentido por las razones expuestas repetidas veces a lo largo de la memoria.

- Estudios en función de la concentración.

Observamos como la intensidad del primer pico de la metalotioneína independientemente de su origen es proporcional a tres veces el contenido metálico que presenta, es decir, es proporcional al número de grupos tiólicos existentes en la muestra. Por lo tanto, proponemos la medida de la intensidad de este pico como método de valoración del contenido de metalotioneína presente en una disolución problema. Así mismo, se obtiene una recta única para la intensidad de corriente del segundo pico en función del contenido de cadmio existente, por lo tanto se propone también como método de valoración. También proponemos la medida de la intensidad del tercer pico como método de valoración del contenido en zinc de las metalotioneínas, aunque hemos de indicar que no se obtiene una recta única sino un conjunto de rectas próximas y, por tanto, al emplear una de las rectas de calibrado correspondiente a una de las metalotioneínas para valorar otra metalotioneína diferente se comete un error mayor que en cualquiera de los dos casos precedentes.

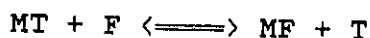
Al valorar una metalotioneína en la recta de otra de diferente origen el error cometido está comprendido entre el 1.7 y el 29 %, por lo tanto, para conseguir mejores resultados debemos trabajar con muestras diluidas.

Las características de los métodos propuestos son las siguientes:

F U N C I O N	CARACTERISTICAS ANALITICAS:
$i_{p_{INT}} = f(3C_{Cd+Zn})$	<p>Ecuación de la recta:</p> $y = -0.405 + 1.4 \cdot 10^6 x$ <p>Intervalo de linealidad:</p> $2.0 \cdot 10^{-6} - 3.57 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ <p>Límite de detección:</p> $9.62 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ <p>Coefficiente de variación:</p> 13.79
$i_{p_{CdT}} = f(C_{Cd})$	<p>Ecuación de la recta:</p> $y = -1.015 + 6.07 \cdot 10^6 x$ <p>Intervalo de linealidad:</p> $4.5 \cdot 10^{-7} - 9.6 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ <p>Límite de detección:</p> $2.63 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ <p>Coefficiente de variación:</p> 16.22
$i_{p_{ZnT}} = f(C_{Zn})$	<p>Ecuación de la recta:</p> $y = 0.0177 + 9.57 \cdot 10^6 x$ <p>Intervalo de linealidad:</p> $2.5 \cdot 10^{-7} - 3.15 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ <p>Límite de detección:</p> $9.62 \cdot 10^{-8} \text{ M}$ <p>Coefficiente de variación:</p> 26.40

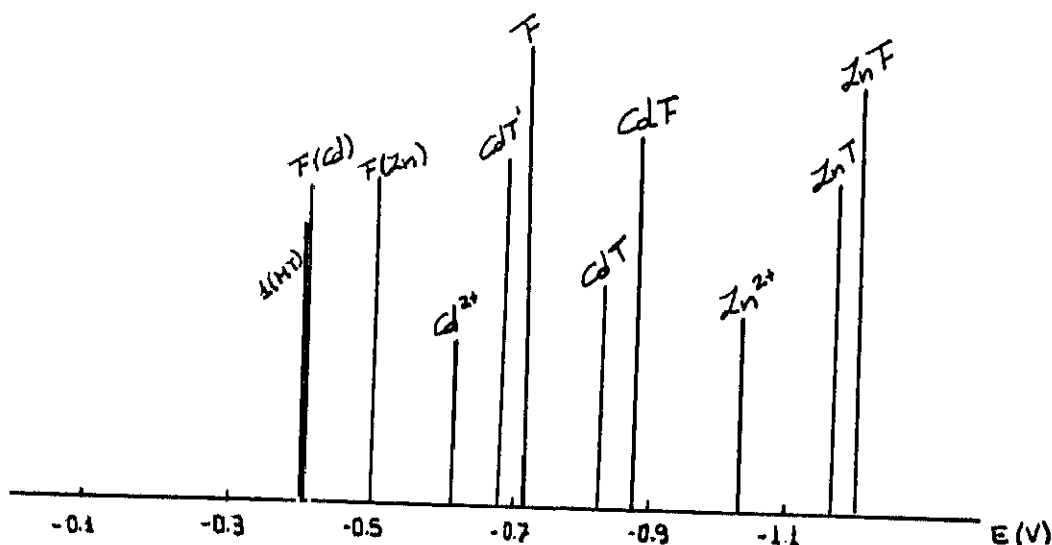
Metalotioneína + fragmento

La adición del fragmento a una disolución de metalotioneína provoca el desplazamiento de los cationes cadmio y zinc, inicialmente contenidos en la metalotioneína y asociados a la misma. Se forman dos complejos metal-fragmento lo que concuerda con el equilibrio termodinámico que se podía prever según la diferencia de valores entre las constantes de asociación MT y MF, éstos últimos más estables.



La mezcla metalotioneína más fragmento origina un polarograma complejo con diferentes picos que se pueden identificar.

Del conjunto de los resultados obtenidos por polarografía se pueden asignar los potenciales de los diferentes picos a los compuestos que intervienen en el proceso electroquímico. Estos se muestran en el esquema siguiente:



Siendo:

I(MT)	primer pico de las metalotioneínas, atribuido a la oxidación del mercurio del electrodo en presencia de los tioles asociados a cadmio y zinc,
F(Cd)	pico atribuido a la oxidación del mercurio en presencia de los grupos tiólicos del complejo fragmento-cadmio,
F(Zn)	pico atribuido a la oxidación del mercurio en presencia de los grupos tiólicos del complejo fragmento-zinc,
Cd^{2+}	pico debido al catión cadmio(II) libre en disolución,
Cd-T	pico atribuido al complejo mayoritario cadmio-tioneína,
Cd-T'	pico atribuido al segundo complejo cadmio-tioneína, que aparece con el tiempo,
F	pico atribuido a la oxidación del mercurio en presencia de los grupos tiólicos del fragmento,
Cd-F	pico atribuido al cadmio complejoado con el fragmento,
Zn^{2+}	pico debido al catión zinc(II) libre en disolución,
Zn-T	pico atribuido complejo zinc-tioneína,
Zn-F	pico atribuido al complejo zinc-fragmento.

ANEXO I

ANEXO I

La extracción de metalotioneína se practicó utilizando la propiedades de termoestabilidad de esta proteína, su peso molecular y su absorptividad en el ultravioleta debida a los enlaces metal-tiolato y grupos amidicos y tiólicos libres, propiedades que nos permitieron aislarlas, de otras proteínas de mayor peso molecular y menos estables frente al calor y, su detección.

Los animales empleados eran ratas macho de raza Wistar que se dividieron en cuatro grupos diferentes:

- a) grupo de animales control
- b) grupo de animales sometidos a una dieta que las provocó anemia ferropénica
- c) grupo de animales anémicos que fueron posteriormente tratados con cloruro de zinc (1 mg Zn/Kg rata/día) por via intraperitoneal durante 5 días.
- d) grupo de animales anémicos que fueron posteriormente tratados con cloruro de cadmio (1 mg Cd/Kg rata/día) por via intraperitoneal durante 5 días.

Una vez finalizados los distintos tratamientos, se procedió a extraer la sangre de los animales por punción cardíaca, bajo anestesia con éter y muerte consecutiva. Después se procede a la disección de los diversos órganos, en nuestro caso mucosa intestinal. Esta se aísla por raspado con una lengüeta de plástico. Se pesan los órganos en fresco y se congelan rápidamente a -20°C en tubos de 4x0.7 cm, previamente tarados.

Se homogeneiza el tejido mediante "ULTRA-TURRAX" en tampón TRIS HCl $2.5 \cdot 10^{-1}$ M y pH 7.4 (1:3 p/v) obteniendose un extracto del 25% (p/v). Los sobrenadantes se sometieron a ultrasonido en tres periodos de 20 segundos, en un aparato de ultrasonido MSE 1765. Se centrifuga a 40000 r.p.m. durante 60 minutos en una centrífuga CENTRIKON T-2080. Seguidamente, se calienta a 85°C

durante 5 minutos y se vuelve a centrifugar, esta vez a 10000 r.p.m. durante otros 5 minutos. El sobrenadante se somete a posterior purificación.

El extracto anteriormente obtenido de mucosa gástrica se deposita en una columna de Sephadex G-50 "fine" de Pharmacia Fine Chemicals (Upsala, Suecia) de diámetro interior 2.5 cm y 70 cm de altura.

Las fracciones eluidas se recogieron mediante un equipo LKB, donado por la Fundación Alexander von Humboldt y constituido por:

Detector ultravioleta

Registrador tipo 6520

Colector de fracciones UltraRac

Bomba peristáltica 4912A

y se mantuvieron en una cámara frigorífica a 4°C. La calibración de la columna se verificó con moléculas de masa molecular relativa conocida, que engloban a las estudiadas, estas macromoléculas son:

β -lactoglobulina (Mr: 18400)

lisozima (Mr: 14300)

ribonucleasa (Mr: 13700)

citocromo-c (Mr: 12400)

triptófano (Mr: 204)

Se recogieron las fracciones 30, 32, 33 y 34 que se leyeron en un espectrofotómetro U.V.-visible, modelo Unicam SP 1800, a 254 y 262 nm, estas fracciones corresponden a los picos donde se eluyen las metalotioneínas.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. Herbert, E.H., Schramel, P., Drash, G.A., Kretschmer, E., Summer, K.H. "Speciation of trace elements in human tissues: Role of Metallothioneins". in: Trace Analytical Chemistry in Medicine and Biology, vol. 4. Walter de Gruyter & Co. (1987).
2. Jeremias H.R. Kägi and Monica Nordberg, eds. Birkhäuser Verlag, Base/Boston/Stuttgart, 1979.
3. Kägi, J.H.R., Kojima, Y. Kissling, M.M. and Lerch K. Excerpta Medica (C.F.S. 72), 223.(1980)
4. Cornelis, R., Specke, A. and Hoste, J. Anal. Chim. Acta, 78, 317, (1978).
5. Heydorn, K. In: "report RISO-R-419", Roskilde, Denmark, (1980).
6. Elemental analysis of biological materials, Current Problems and Techniques with special reference to trace elements, Tech. Rep. Ser. No. 197, IAEA, Vienna, (1980).
7. Iyengar, G.V. Nutr. Res., Suppl. 1, 12, (1985).
8. Versieck, J. Crit. Rev. Clin. Lab. Sci., 22, 97, (1985).
9. Devlin, T.M. "Bioquímica", Ed. Reverté, S.A. (1985).
10. Margoshes, M., and Vallee, B.L. J. Am. Chem. Soc. 79, 4813. (1957).
11. Kägi, J.H.R., and Vallee, B.L. J. Biol. Chem. 235, 3460. (1960).
12. Kägi, J.H.R., and Vallee, B.L. J. Biol. Chem. 236, 2435. (1961).
13. Piscator, M. Nord. Hyg. Tidskr. 45, 76. (1964).
14. Pulido, P., Kägi, J.H.R., and Vallee, B.L. Biochemistry, 5, 1768. (1966).
15. Kägi, J.H.R. and Vallee, B.L. Int. Congr. Biochem. Abstr. 5th, 35. (1961).
16. Ulmer, D.D., Kägi, J.H.R., and Vallee, B.L. Biochem. Biophys. Res. Commun. 8, 327. (1962).
17. Vallee, In: Fourth International Congress of Biochemistry, Vienna, 1958. Vol., VIII-Proteins, pp. 138-165. Pergamon press. (1960).

18. Kägi, J.H.R. Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol., 19, 340. (1960).
19. Nordberg, G.F., Nordberg, M., Piscator, M., and Vesterberg, O. Biochem. J. 126, 491. (1972).
20. Kägi, J.H.R., Himmelhoch, S.R., Whanger P.D., Bethune, J.L., and Vallee, B.L. J. Biol. Chem. 249, 3537. (1974).
21. Kojima, Y., Berger, C., Vallee, B.L., and Kägi, J.H.R. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 3413. (1976).
22. Galdes, A., Vasak, M., Hill, H.A.O., and Kägi, J.H.R. FEBS Lett. 92, 17. (1978).
23. Kägi, J.H.R., and Kojima, Y. Nomenclature of metallothionein: a proposal. Jeremias H.R. Kägi and Monica Nordberg, eds. Birkhäuser Verlag, 1979. Pp. 141. (1979).
24. Webb, M. In: "The Chemistry, Biochemistry and Biology of Cadmium". (Ed. Webb, M.), Amsterdam (Elsevier/North Holland) pp. 195. (1979).
25. Otvos, J.D., and Armitage, I.M. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, (12), 7094. (1980).
26. Suzuki, K.T. and Yamamura, M. Biochemical Pharmacology, 29, 689. (1980).
27. Minkel, D.T., Poulsen, K., Wielgus, S., Shaw, C.F. III and Petering, D.H. Biochem. J., 191, 475. (1980).
28. Briggs, R.W. and Armitage, I.M. J. Biol. Chem., 257, 1259. (1982).
29. Nielson, K.B. and Winge, D.R. J. Biol. Chem., 258, (21), 13063. (1983).
30. Kägi, J.H.R., Vasák, M., Lerch, K., Gild, D.E.O., Hunziker, P., Bernard, W.R. and Good, M. Environmental Health Perspectives, 54, 93. (1984).
31. Nielson, K.B., Atkin, C.L. and Winge, D.R. The Journal of Biological Chemistry, 260, (9), 5342. (1985).
32. Braun, W., Wagner, G., Wörgötter, E., Vasák, M., Kägi, J.H.R., and Wüthrich, K. J. Mol. Bio., 187, 125. (1986).
33. Winge, C.R., and Garvey, J.S. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 2472. (1983).
34. Winge, C.R., Gray, W.R., Zelazowski, A., and Garvey, J.S. Arch. Biochem. Biophys., 245, (1), 254. (1986).

35. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (CBN) Nomenclature of multiple forms of enzymes. Recommendations (1976). J. Biol. Chem. 252, 5939. (1977).
36. Olafson, R.W., Sim, R.G. and Kearns, A. In: "Metallothionein" Jeremias H.R. Kägi and Monica Nordberg, eds. Birkhäuser Verlag, Base/Boston/ Stuttgart, 1979. Pp. 197-204. (1979).
37. Metallothionein. In: Proceedings of the "First International Meeting on Metallothionein and other Low Molecular Weight Metal-binding Proteins". Kägi, J.H.R. and Nordberg, M., eds. (Birkhäuser Verlag), pp. 52, (1978).
38. Boquegneau J.M., Gerdan Ch., and Disteche A. FEBS Lett. 55, 173. (1975).
39. Lee, S.S., Mate B.R., Von der Trenck K.T., Rimerman R.A. and Bühler D.R. Comp. Biochem. Physiol. 57C, 45. (1977).
40. Olafson R.W. and Thompson J.A.J. Mar. Biol. 28, 83. (1974).
41. Kissling M.M. and Kägi J.H.R. FEBS Lett. 82, 247. (1977).
42. Piotrowski, J.K., Trojanowska, B. and Sapota A. Arch. Toxicol., 32, 351. (1974).
43. Bremner, I., and Young, B.W. Chem. Biol. Interact. 19, 13. (1977).
44. Trojanowska, B. and Piotrowski, J.K. Bromatol. Chem. Toxicol., 32, 137. (1974).
45. Hartmann, H.-J., and Weser, U. Biochim. Biophys. Acta 491, 211. (1977).
46. Rydén, L. and Deutsch, H.F. J. Biol. Chem., 253, 519. (1978).
47. Nordberg, M., Nordberg, G.F. and Piscator, M. Environ. Physiol. Biochem. 5, 396. (1975).
48. Endresen, L., Bakka, A. and Rugstad, E. Cancer research 43, 2918. (1983).
49. Nickless G., Stenner R., and Terrille N. Mar. Pollut. Bull. 3, 188. (1972).
50. Lerch, K., Ammer, D. and Olafson, R.W. The Journal of Biological Chemistry, 257, (5), 2420. (1982).
51. Carterline J.L. Jr., and Yip G. Archs environ. contam. Toxic, 3, 319. (1975).
52. Howard, A.G. and Nickless, G. J. Chromatogr., 104, 457. (1975).

53. Nöel-Lambot, F. *Experientia*, 32, 324. (1976).
54. M: J. Bebianno and W.J. Langston *Portugaliae Electrochima Acta*, 7, 59. (1989).
55. Frazier, J.M., George, S.S., Overnell, J., Coombs, T.-L. and Kägi, J.H.R. *Comp. Biochem. Physiol.* 80C (2), 257. (1985).
56. Suzuki, K.T. In "Proceedings of Second International Meeting of MT and other low molecular weight metal binding proteins". (Ed. Kägi, J.H.R.) Basel Switzerland (Birkhauser Verlag). (1986).
57. Kojima and Kägi *TIBS* April, 90. (1978).
58. Prinz, R. and Weser, U. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 356, 767. (1975).
59. Ammer, D., Budry, R. and Lerch, K. *Experientia*, 34, 905. (1978).
60. Lerch, K. In: *Metallothionein*. Kägi, J.H.R. and Nordberg, M., eds. Birkhäuser Verlag, Basel/Boston/Stuttgart, pp. 173. (1979).
61. Lerch, K. *Nature*, 284, 368. (1980).
62. MacLean, F.I., Lucis, O.J., Shaikh, Z.A. and Jansz, E.R. *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, 31, 699. (1972).
63. Higham, D.P. and Sadler, P.J. *Inorg. Chim. Acta*, 79, 140. (1983).
64. Rauser, W.E. and Curvetts, N.R. *Nature*, 287, 563. (1980).
65. Bartolf, M., Brennan, E. and Price, C.A. *Plant Physiol.*, 66, 438. (1980).
66. Kägi, J.H.R. and Nordberg, M. In: "*Metallothionein*" Kägi, J.H.R. and Nordberg, M., eds. Birkhäuser Verlag. (1979).
67. Vasák, M., Berger, C., Kägi, J.H.R. *FEBS Lett.* 168, 174. (1984).
68. Johnson, B.A., and Armitage, I.M. *Inorg. Chem.*, 26, 3139. (1987).
69. Bühler, R.H.O., and Kägi, J.H.R. Human hepatic metallothioneins. *FEBS Lett.* 39, 229. (1974).
70. Brady, F.O., Panemangalore, M., Day, F.A., Fiskin, A.M., and Peterson, G. In: "*Metallothionein*", Jeremias H.R. Kägi and Monica Nordberg, eds. Birkhäuser Verlag, pp. 261-271. (1979).

71. Geller, B.L. and Winge, D.R. Arch. Biochem. Biophys., 213, (1), 109. (1982).
72. Weser, U., Rupp, H., Donay, F., Linnermann, F., Voelter, W., Voetsch, W., and Jung, G. Eur. J. Biochem. 39, 127. (1973).
73. Bremner, I. and Davies, N.T. Biochem. J. 149, 733. (1975).
74. Tsunoo, H., Kino, K., Nakajima, H., Hata, A., Huang, I.-Y. and Yoshida A. J. Biol. Chem., 253, 4172. (1978).
75. Huang, I-Y., Tsunoo, H., Kimura, M., Nakashima, H., and Yoshida, A. In: "Metallothionein" Jeremias H.R. Kägi and Monica Nordberg, eds. Birkäuser Verlag, pp.169-172, 1979.
76. Kojima, Y., Berger, C., and Kägi, J.H.R. (1979). In: "Metallothionein" Jeremias H.R. Kägi and Monica Nordberg, eds. Birkäuser Verlag, pp. 153-161, 1979.
77. Kimura, M., Otaki, N., and Imano, M. In: "Metallothionein" Jeremias H.R. Kägi and Monica Nordberg, eds. Birkäuser Verlag, pp. 163-168, 1979.
78. Kissling, M.M., and Kägi, J.H.R. (1979). In: "Metallothionein" Jeremias H.R. Kägi and Monica Nordberg, eds. Birkäuser Verlag, pp. 145-151, 1979.
79. Hunziker, P.E., and Kägi, J.H.R. In: "Metalloproteins with non redox roles". Vol.II. Ed. Harrison, P., M. McMillan, (Houndmills and London), pp. 149. (1985).
80. Kägi, J.H.R., Vasák, M., Lerch, K., Gild, D.E.O., Hunziker, P., Bernard, W.R. and Good, M. Environmental Health Perspectives, 54, 93. (1984).
81. Mehra, R.K., Mehta, U., Kaur, G. and Bansal, R. Research Bulletin Science of the Punjab University, 3, parts: III-IV, 105. (1986).
82. Lerch, K., Ammer D. and Olafson, R.W. The Journal of Biological Chemistry, 257, 2420. (1982).
83. Rupp, H., and Weser, U. Biochim. Biophys. acta 533, 209. (1978).
84. Bühler, R.H.O., and Kägi, J.H.R. In: "Metallothionein" J.H.R. Kägi and M. Noedberg, eds. Birkhäuser Verlag, pp. 211. (1979).
85. Rupp, H., Voelter, W., and Weser, U. FEBS Lett.40, 176. (1974).
86. Vasák, M. Galdes, A., Hill, H.A.O., Kägi, J.H.R., Bremner, I., and Young, B.W. Biochemistry 19, 416. (1980).
87. Rupp, H., and Weser, U. FEBS Lett. 44, 293. (1974).

88. Galdes, A., Hill, H.A.O., Kägi, J.H.R., Vasák, M., Bremner, I., and Young, B.W. In: "Metallothionein" Jeremias H.R. Kägi and Monica Nordberg, eds. Birkhäuser Verlag, pp. 241. (1979).
89. Rupp, H., and Weser, U. In: "Metallothionein" Jeremias H.R. Kägi and Monica Nordberg, eds. Birkhäuser Verlag, pp. 231. (1979).
90. Otvos, J.D., and Armitage, I.M. J. Am. Chem. Soc., 101, 7734. (1979).
91. Boulanger, Y., Goodman, C.M., Forte, C.P., Fesik, S.W. and Armitage, I.M. Proc. Natl. Acad. Sci., 80, 1501. (1983).
92. Vasák, M., Galdes, A., Hill, H.A.O., Kägi, J.H.R., Bremner, I., and Young, B.W. Biochemistry, 19, 416. (1980).
93. Sadler, P.J., Bakka, A., and Beynon, P.J. FEBS Lett. 94, 315. (1978).
94. Fiskin, A.M., Peterson, G., and Brady, F.O. Ultramicroscopy 2, 389. (1977).
95. Weser, U., and Rupp, H. In: "Metallothionein" Jeremias H.R. Kägi and Monica Nordberg, eds. Birkhäuser Verlag, pp. 221-230. (1979).
96. Weser, U., Hartmann, H-J., Fretzdorff, A., and Strobel, G-J. Biochim. Biophys. Acta, 493, 465. (1977).
97. Abrahams, I. L., Garner, C.D., Diakun, G.P., Hasnain, S.S., Armitage, I.M. In: "Proceedings of the Second International Meeting on MT and other low molecular weight metal binding proteins". Ed. Kägi, J.H.R., Birkhauser, Verlag, (1986).
98. Vasák, M. and Bauer, R. J. Amer. Chem. Soc., 104, 2336. (1982).
99. Vasák, M., Kägi, J.H.R. and Hill, H.A.O. Biochemistry, 20, 2852. (1981).
100. Vasák, M., Kägi, J.H.R., Holmquist, B. and Vallee, B.L. Biochemistry, 20, 6659. (1981).
101. Ulmer, D.D., and Vallee, B.L. Adv. Chem. Ser. 100, 187. (1971).
102. Kägi, J.H.R. Int. Congr. Biochem. Abstr., 8tn, Switzerland, September, 1970, pp. 130. (1970).
103. Feldman, S.L., Failla, M.L., and Cousin, R.J. Biochim. Biophys. Acta 544, 638. (1978).
104. Feldman, S.L., Squibb, K.S., and Cousins, R.J. J. Toxicol. Environ. Health 4, 805. (1978).

105. Webb, M. binding of cadmium ions by rat liver and kidney. *Biochem. Pharmacol.* 21, 2751. (1972).
106. Kägi, J.H.R., Kojima, Y., Kissling, M.M. and Lerch, K. *Excerpta Medica CFS* 72, 223. (1980).
107. Winge, D.R. In: "Proceedings of the Second International Meeting on MT and other low molecular weight metal binding proteins". Ed. Kägi, J.H.R., Birkhauser, Verlag, (1986).
108. Winge, D.R. and Miklossy K.A. *Arch. Biochem. Biophys.* 214, 80. (1982).
109. Nielson, K.B. and Winge, D.R. *J. Biol. Chem.*, 259, 4941. (1984).
110. Winge, D.R. and Miklossy, K.-A. *The Journal of Biological Chemistry*, 257, (7), 3471. (1982).
111. Wagner, G., Neuhaus, D., Wörgötter, E., Vasák, M., Kägi, J.H.R., and Wüthrich, K. *J. Mol Bio.*, 187, 131. (1986).
112. Vasák, M. and Kägi, J.H.R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, (11), 6709. (1981).
112. Vasák, M., and Kägi, J.H.R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78, 6709. (1981).
113. Schmitz, G., Minkel, D.T., and Shaw, C.F. III. *J. Inorg. Biochem.* 12, 293. (1980).
125. Maiti, I., Mbikay, M., Marengo, C., and Thirion, J.-P. *Journal of Cellular Physiology*, 112, 35. (1982).
114. Johnson, B.A. and Armitage, I.M. *Inorganic Chemistry*, 36, 3139. (1987).
115. Vasák, M., Berger, C. and Kägi, J.H.R. *FEBS Lett.* 168, (2), 174. (1984).
116. Bremner, I., and Mehra, R.K. *Chemical Scripta*, 21, 117. (1983).
117. Nordberg, M. and Nordberg, G.F. *Environ. Health Perspect.* 12, 103. (1975).
118. Bremner, I., and Young, B.W. *Biochem. J.* 155, 631. (1976).
119. Bremner, I., and Young, B.W. *Biochem. J.* 157, 517. (1976).
120. Laib, J.E., Shaw II, C.F., Petering, D.H., Eidsness, M.K., Elder, R.C. and Garvey, J.S. *Biochemistry* 24, 1977. (1985).
121. Nordberg, M. and Kojima, Y. In: *Metallothionein*. J.H.R. Kägi and M. Nordberg, Eds., Birkhäuser Verlag, Basel, pp. 41. (1979).

122. Mehra, R. K., and Bremner, I. *Biochem. J.*, 219, 539. (1984).
123. Bremner, I., and Vasak, M. *Biochem. J.*, 236, 585. (1986).
124. Olafson, R.W., Sim, R.G. and Boto, K.G. *Comp. Biochem. Physiol.* 62B, 407. (1979).
126. Shaikh, Z.A., and Lucis, O.J. Isolation of cadmium-binding proteins. *Experientia* 27, 1024. (1971).
127. Shaikh, Z.A., and Lucis, O.J. *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 30, 238. (1971).
128. Kojima, Y., and Kägi, J.H.R. *Trends Biochem. Sci.* 3, 90. (1978).
129. Bethune, J.L., Budreau, A.J., Kägi, J.H.R. and Vallee, B.L. In: "Proceedings of the First International Meeting of MT and other low molecular weight metal binding proteins". Kägi, J.H.R., eds. Birkhauser Verlag. pp. 207. (1979).
130. Cherian, M.G. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 61, 920. (1974).
131. Ly, T.Y., Kraker, A.J., Shaw, C.F. and Petering, D.H. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 77, 6334, (1980).
132. Prinz, R., and Weser, U. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 356, 767. (1975).
133. Kägi, J.H.R., Kojima, Y., Kissling, M.M. and Lerch, K. *Excerpta Medica CFS* 72, 223. (1980).
134. Sokolowski, G. and Weser, U. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 356, 1715. (1975).
135. Rupp, H., Voelter, W. and Weser, U. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. Bd.*, 356S, 755. (1975).
136. Winge, D.R., Premakumar, R. and Rajagopalan, K.V. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 170, 242. (1975).
137. Iniesta, M.P., Rubio, M.C. and Ribas, B. In: "Second International Meeting on Metallothionein", Abstracts book, Zürich University, Switzerland, pp.66. (1985).
138. Benesch, R.E. and Benesch, R. (1955). *J. Am. Chem. Soc.*, 77, 5877-5881.
139. Clark, L.B. and Simpson, W.T. (1965). *The Journal of Chemical Physics*, 43, (10), 3666-3672.
140. Thompson, S.D., Carrol, D.G., Watson, F., O'Donnell, M. and McGlynn, S.P. (1966). *The Journal of Chemical Physics*, 45, (5), 1367-1379.

141. Beltramini, M., and Lerch, K. FEBS Lett, 127, 201. (1981).
142. Beltramini, M., Munger, K., Gremann U.A. and Lerch, K. In "Proceedings of Second International Meeting of MT and other low molecular weight metal binding proteins". Ed. Kägi, J.H.R. Birkhauser Verlag. (1986).
143. Petering, D.H., Goodrich, M., Hodgman, W., Krezoski, S., Weber, D., Shaw III, C.F., Spieler, R. and Zettergren, L. In: "Biomarkers of Environmental Contamination", Ed. J.F. McCarthy and L.R. Shugart, pp.239, (1990).
144. Squibb, K.S. and Cousin, R.J. Environ. Physiol. Biochem., 4, 24. (1974).
145. Squibb, K.S. and Cousin, R.J. Biochem. Biophys. Res. Comm., 75, 806. (1977).
146. Durman, D.M. and Palmiter, R.P. J. Biol. Chem., 256, 5712. (1981).
147. Cousins, R.J. In: "Physiological Reviews", 65, 238. (1985).
148. Ribas, B., Bando, I., Martinez Trueba, M.M., Santamaria, J. and Morcillo, M.A. Proceeding of the fourth interantional simposium on nephrotoxicity by: M. Dekker, New York, Renal Failure, (1990).
149. Richards, M.P. and Cousins, R.J. Bioinorg. Chem., 4, 215. (1975).
150. Richards, M.P. and Cousins, R.J. Biochem. Biophys. Res. Commun. 64, 1215. (1975).
151. Squibb, K.S., Cousins, R.J. and Feldman, S.L. Biochem. J., 164, 223. (1977).
152. Ribas, B. and Iniesta, M.P. An. Real. Acad. Farm., 55, 533, (1989).
153. Iniesta M.P., Sánchez-Reus, M.I. and Ribas, B. In: Proceedings of the fourth interantional symposium on nephrotoxicity, M. Dekker, New York, Renal Failure, (1990).
154. Palmiter, R.D. In: "Metallothionein II", Basel, Switzerland: Birkhäuser-Verlag, pp. 63-80. (1986).
155. Bremner, I. In "Proceedings of Second International Meeting of MT and other low molecular weight metal binding proteins". Ed. Kägi, J.H.R. Birkhauser Verlag. (1986).
156. Petering, D.H., Loftsgaarden, J., Schneider, J., and Fowler B. Environmental Health Perspectives 54, 73. (1984).

157. Sobocinski, P.Z., Canterbury, W. J., Jr., Mapes, C.A. and Dinterman, R.E. *Am. J. Physiol.*, 234, E399. (1978).
158. Bakka, A.B., Endresen, L., Johnsen A.B.S., Edminson, P.D. and Rugstad, H.E. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 61, 215. (1981).
159. Endersen, L., Schjerven, L. and Rugstad, H.E. *Pharmacol. Toxicol.*, 55, 183. (1984).
160. Gonzalez Barón, M., Iniesta, M.P., Sánchez-Reus, M.I. and Ribas, B. *Toxicol. Environ. Chem.*, 13, 161. (1987).
161. Sánchez-Reus, M.I., Iniesta, M.P. and Ribas, B. In: "Trace Element Anal. Chem. Med. Biol." P.Brätter and Schramel, eds., Walter de Gruyter, Co., vol. 5, 562. (1988).
162. Frazier, J.M. and Kingsley, B.S. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 38, 583. (1986).
163. Panemangalore, M. and Brady, F.O. *J. Biol. Chem.*, 253, 7898. (1978).
164. Failla, M.L. and Cousins, R.J. *Biochim. Biophys. Acta* 543, 293. (1978).
165. Bremner, I. and Davies, N.T. *Br. J. Nutr.*, 36, 101. (1976).
166. Premakumar, R., Winge, D.R., Wilwy, R.D. and Rajagopalan, K.V. *Arch. Biochem. Biophys.*, 170, 267. (1975).
167. Shaik, Z.A. and Smith, J.C. *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, 34, 266. (1975).
168. Shaik, Z.A. and Smith, J.C. In: "International Conference on Heavy Metals in the Environment", Abstracts, Toronto, Canada, October, 1975, pp.B108. (1975).
169. Shaik, Z.A. and Smith, J.C. *Chem. Biol. Interact.*, 19, 161. (1977).
170. Mehra, R.K. and Bremner, I. *Biochem. J.*, 227, 903. (1985).
171. Andersen, R.D., Winter, W.P., Maher, J.J., and Berstein, I.A. *Biochem. J.* 174, 327. (1978).
172. Cousin, R.J. In: "Metallothionein". Jeremias H.R. Kägi and Monica Nordberg, eds. Birkäuser Verlag, pp.293. (1979).
173. Shaik, Z.A. and Smith, J.C. *Chem. Biol. Interact.*, 15, 327. (1976).
174. Cain, K. and Holt, D.E. *Chem. Biol. Interact.*, 28, 91. (1979).

175. Sternlieb, I. and Goldfischer, S. In: "Lysosomes in Biology and Pathology", vol. 5, J.T. Dimle and Dean R.T., eds. North Holland Publishing Co. (1976).
176. Johnson, G.F., Morrel, A.G., stockert, R.J. and Sternlieb, I. Hepatology, 1, 243. (1981).
177. Bremner, I., Menhara, R.K., Morrison, J.N. and Wood, A.N. Biochem. J., 235, 735. (1986).
178. Bremner, I., Williams, R.B., and Young, B.W. Br.J. Nutr. 38, 87. (1977).
179. Yohida, A., Kaplan, B.E. and Kimura, M. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 76,(1), 486. (1979).
180. Terhaar, C.J., Vis, E., Roudabush, R.L. and Fassett, D.W. Toxicol. Appl. Pharmacol., 7, 500. (1965).
181. Ito, T. and Sawauchi, K. Okajimas Folia Anat. Jpn., 42, 107. (1966).
182. Gabbiani, G., Baic, D. and Déziel, C. Can. J. Physiol. Pharmacol., 45, 443. (1967).
183. Nordberg, Gt.F., Piscator, M. and Lind, B. Acta Pharmacol. Toxicol., 29, 456. (1971).
184. Nordberg, Gt.F., Piscator, M. and Nordberg, M. Acta Pharmacol. Toxicol., 30, 289. (1971).
185. Suzuki, Y. and Yoshikawa, H. Ind. Health 14, 25. (1976).
186. Leber, A.P. and Miya, T.S. Toxicol. Appl. Pharmacol., 37, 403. (1976).
187. Probst, G.S., Bousquet, W.F. and Miya, T.S. Toxicol. Appl. Pharmacol., 39, 51. (1977).
188. Probst, G.S., Bousquet, W.F. and Miya, T.S. Toxicol. Appl. Pharmacol., 39, 61. (1977).
189. Hildebrand, C.E., Griffith, J.K., Tobey, R.A., Walters, R.A. and Enger, M.D. Dev. Toxicol. Environ. Sci., 9, 279. (1982).
190. Rugstad, H.E. and Norseth, T. Biochem. Pharmacol., 27, 647. (1978).
191. Hildebrand, C.E. and Cram, L.S. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 161, 438. (1979).
192. Hamer, D., Thiele, D.J., Jemontt, J.E. Science, 211, 685. (1985).

193. Thiele, D.J., Walling, M., Wright, C. and Hamer, D. In: "Proceedings of the Second International Meeting of MT and other low molecular weight metal binding proteins". Kagi, J.H.R., eds. Birkhauser Verlag. (1986).
194. J.M. Bouqueneau and F. Noel Lambot, In: "Colloque GABIM", 1978, La Rochette, pp. 219. (1978).
195. Ribas, B. and Iniesta M.P. An. Real Acad. Farm., 55, 533. (1989).
196. Foulkes, E.C. "Biological Roles of Metallothionein" Foulkes, E.C. Ed. Amsterdam: Elsevier North Holland, passim. (1982).
197. Petering, D.H. and Fowler B.A. Environmental Perspectives 65, 217. (1986).
198. Webb, M. and Cain, K. Biochemical Pharmacology, 31 (2), 137. (1982).
199. Garvey, J.S., Vander Mallie, R.J. and Chang, C.C. Methods Enzymol., 84, 121. (1982).
200. Mehra, R.K. and Bremner, I. Biochem. J. 213, 459. (1983).
201. Garvey, J.S. and Chang, C.C. Science, 214, 805. (1981).
202. Black, M., Fell, G.S., Aughey, E., Scott, R., Bremner, I. and Mehra, R.K. In: "Proc. Trace Element Metabolism in Man and Animals". Mills, C.F., Bremner, I. and Chesters J.K., eds. pp. 614. (1985).
203. Cherian, M.G. and Shaikh, Z.A. Biochem. Biophys. Res. Commun. 65, 863. (1975).
204. Webb, M. and Etienne, A.T. Biochem. Pharmacol., 26, 25. (1977).
205. Bremner, I., Hoekstra, W.G., Davies, N.T. and Williams, R.B. In: "Trace Element Metabolism in Man and Animals-3". Kirchgessner, M., eds., pp.44. (1978).
206. Sato, M., Mehra, R.K. and Bremner, I. J. Nutr., 114, 1863. (1984).
207. Law, A.Y.C., Szymanska, J.A. and Stillman, M.J. Chemical Toxicology and Clinical Chemistry of Metals. (1983).
208. Mehra, R.K. "Development and Use of a Radioimmuno-assay for Studies of Metallothionein Metabolism in Animals". Ph. D. Thesis, Aberdeen University, UK. (1983).
209. Bremner, I. and Marshall, R.B. Br. J. Nutr., 32, 293. (1974).

210. Bremner, I. In: "Metallothionein". Jeremias H.R. Kägi and Monica Nordberg, eds. Birkäuser Verlag, pp. 273. (1979).
211. Ribas, B., Brenes, M.A., De Pascual F.J., Del Rio, J. and Sánchez-Reus, M.I. In: "Trace Element Anal. Chem. Med. Biol.", Walter de Gruyter Co., vol. 4, 317, (1987).
212. Ribas, B., Pelayo, J.F. and Rodrigues, N.L. In: "Trace Element Anal. Chem. Med. Biol.", vol.5, 548, (1988).
213. Ribas, B., Brenes, M.A. and De Pascual, F.J. Toxicol. Environ. Chem., 23, 33. (1989).
214. Bondia, S., Ribas, B., De la Torre, A. and Santos Ruiz, A. Adv. Physiol. Sci., 12, Nutrition, Digestion, Metabolism., 71. (1981).
215. Ribas, B. In: "Trace Element Anal. Chem. Med. Biol.", P. Brätter and P. Schamel, eds. Walter de Gruyter Co., vol.2, pp. 181. (1983).
216. Iniesta, M.P., Sánchez-Reus, M.I. and Ribas, B. Toxicol. Environ. Chem., 23, 153. (1989).
217. Ribas, B. and Pelayo, J.F. Toxicol. Environ. Chem., 23, 9. (1989).
218. Udom, A. and Brady, F.O. Biochem. J., 187, 329. (1980).
219. Iyengar, G.V. Anal. Chem., 54, 554A, (1982).
220. Snyder, W.S., Cook, M.J., Nasset, E.S., Karhausen, L.R., Howells, G.P. and Tipton, I.H. "Report of the Task Group on Reference Man", ICRP-23, Pergamon Press, Oxford, (1975).
221. Iyengar, G.V., Kollmer, W.E. and Bowen, H.J.M. In: "The elemental composition of human tissues and body fluids", Verlag Chemie, Weinheim, (1978).
222. Hamilton, E.I. In: "The chemical elements and man, measurements, perspectives, applications", Charles C. Thomas, eds. Springfield, IL, (1979).
223. Bowen, H.J.M. In: "Environmental chemistry of the elements", Academic Press, (1979).
224. Iyengar, G.V. IAEA-TECDOC, 269, (1982).
225. Schoeder, H.A. In: "The trace elements and nutrition: some positive and negative aspects". Faber and Faber, eds. (1976).
226. Mertz, W. Science, 213, 1332, (1981).
227. Golden, M.H.N. Human Nutr. Clin. Nutr. 36C, 185, (1982).

228. Quantitative trace analysis of biological material. H.A. McKenzie, eds., Smythe, Elsevier, (1988).
229. Underwood, E.J., "Trace elements in human and animal nutrition", 4th. ed., Academic Press, New York, (1977).
230. Feinendegen, L.E. and Kasperek, K. "Trace elements in medicine", in Internationa Workshop on Trace Elements in Medicine and Biology, vol.1, Braetter, P.K. Schamel, P., Eds., de Gruyter, Berlin, (1980).
231. Mertz, W. Ann. N.Y. Acad. Sci., 199, 191, (1972).
232. Nielsen, F.H. "New essential trace element for the live", in Biological trace element research, Ed. G.N. Schrauzer by The Humana Press Inc. (1990).
233. Frieden, E. "A survey of the essential biochemical elements", Biochemical of the essential ultratrace elements, vol.1, Frieden E., Plenum Press, (1981).
234. Frost, D.V. Sci. Total Environ., 38, 1, (1984).
235. Cotzias, G.C., In: "Proc. First Annu. Conf. Trace Substances in Environmental Health", vol. 5, Hemphill, D.D., University of Missouri eds., Columbia, (1984).
236. Liebscher, K., y Smith, H. Arch. Environ. Helath, 17, 881, (1968).
237. Frieden, E. In: "Biochemistry of the essential ultratrace elements", vol.1, Grieden, E., ed., Plenum Press, (1984).
238. Batley, G.E. "Trace element speciation: analitical methods and problems", CRC Press. (1990).
239. Tapp, W.N. and Natelson, B.H., FASEB J.2, 2268 (1988).
240. Iyengar, G.V. "Chemical elements in biological systems" in Elemental Analysis of Biological Systems, vol.I. CRC Press, Inc., (1989).
241. Levander, O.A., "Trace element in human and animal nutrition", 5th ed., W. Mertz, ed. Academic. Orlando, Florida. pp. 209, 1986.
242. Iyengar, G.V. In "Elemental composition of human an animal milk", IAEA Tech. Doc. 269, IAEA, Viena. (1982).
243. Smythe, L.E. Chem. Aust., 49, 460. (1982).
244. Versieck, J. and Cornelis, R. Anal. Chim. Acta, 116, 217. (1980).
245. Versieck, J. Trace Element Med., 1, 2. (1984).

246. Iyengar, G.V. In: "Concentration of 15 trace elements in some selected adult human tissues and body fluids of clinical interest from several countries: results from a pilot study for the establishment of reference values". Institute of Medicine, Juelich Nuclear Research Center, Juelich, F.R.G. (1986).
247. Vandecasteele, C., Vanhoe, H., Dams, R. and Versieck, J. In: "Determination of trace elements in human serum by inductively coupled plasma-mass spectrometry. Comparison with nuclear analytical techniques in biological trace elements research", G.N. Schauzer, eds. The Human Press Inc. (1990).
248. Iyengar, G.V., Kollmer, W.E., and Bowen, H.J.M. In: "The elemental composition of human tissues and body fluids", Verlag Chemie Weinheim. (1978).
249. Woittiez, J.R.W. and Iyengar, G.V. In: Trace element analytical Chemistry in Medicine and Biology. Walter de Gruyter & Co. (1988)
250. Smythe, L.E. In: "Environmental Chemistry". Bockris, J.O'M., eds. Plenum. pp 677. (1977).
251. Luckey, T.D. and Venugopal, B. In: "Metal toxicity in mammals, I. Physiologic and chemical basis for metal toxicity". Plenum, New York. (1977).
252. Ahrland, S., Chatt, J. and Davies, N.R. Q. Rev. Chem. Soc., 12, 265. (1958).
253. Pearson, R.G. J. Am. Chem. Soc., 85, 3533. (1963).
254. Nieboer, E. and Richardson, D.H. Environ. Pollut. Ser., B, 1, 3. (1980).
255. Ochiai, E. In: "Bioinorganic Chemistry: An introduction". Allyn and Bacon, 468. (1977).
256. Keith, L.H., Libby, R.A., Grummett, W., Taylor, J.K., Deegan, Jr. and Wentler, J. Anal. Chem., 55, 2210. (1983).
257. Taylor, J.K. Anal. Chem., 56, 130A. (1984).
258. Borman, S.A. Anal. Chem., 58, 586A. (1986).
259. Currie, L.A. Anal. Chem., 40, 586. (1968).
260. Mitchell, J.W. J. Radioanal. Chem., 69, 47. (1981).
261. Hislop, J.S. In: "Trace element analytical chemistry in medicine and biology" Walter de Gruyter & Co. (1980).
262. Versiek, J. and Cornelis, R. In: "Trace elements in human serum or plasma" CRC Press, Inc. (1989).

263. Iyengar, G.V. In: "Elemental analysis of biological systems, vol. I" CRC Press Inc. (1979).
264. Cuantitative trace analysis of biological materials. (Ed. H.A. Mckenzie & L.E. Smythe) ELSEVIER. (1988).
265. Bernhard, M., Brinckman, F.E. and Irgolic, K.J. (1986). In: "The importance of Chemical Speciation in Environmental Processes", eds. M. Bernhard, F.E. Brinckman and P.J. Sadler, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg. pp. 7. (1986).
266. Dunemann, L., Schwedt, G. In: "Trace element analytical chemistry in medicine and biology". Walter de Gruyter & Co. pp. 99. (1988).
267. Williams, D.R. In: "Chemical Toxicology and Clinical Chemistry of Metals". Brown, S.S. and Savory, J., Ed. Academic Press, pp. 167. (1983).
268. Solomons, N.W., Viteri, F., Shuler, T.R. and Nielsen, F.H. J. Nutr., 112, 39. (1982).
269. Reglinski, J. and Smith, W.E. Trends Anal. Chem., 5, 190. (1986).
270. Sadler, P.J. In: "The importance of chemical speciation in environmental processes". Bernhard, M., Brinckman, F.E. and Sadler, P.J., Eds. Springer-Verlag, pp. 563. (1986).
271. Ludin, A.P., Curuso, C., Sass, M. and Berlyne, G.M. Clin. Res., 26, 636A. (1978).
272. Elliott, H.L., Dryburgh, F., Fell, G.S., Sabet, S. and MacDougall, A.I. Br. Med. J., 1, 1101. (1978).
273. Graf, H., Stummvoll, H.K. and Meisinger, V. Lancet, I, 46. (1982).
274. Glennon, J.D. and Sarkar, B. Biochem. J., 203, 15. (1982).
275. Conradi, S., Ronnevi, L. and Stibler, H. J. Neurol. Sci., 37, 95. (1978).
276. Bradwell, A.R. and Burnett, D. Clin. Chim. Acta, 58, 283. (1975).
277. Van der Hamer, C.J. and Joutman, J.P. In: Trace element analytical chemistry in medicine and biology; Bratter, P. and Schramel, P., Eds., Walter de Gruyter, pp. 233. (1980).
278. Sternlieb, I., Van den Hamer, C.J., Morell, A.G., Alpert, S., Gregoriadis, G. and Scheinberg, I. Gastroenterology, 64, 99. (1973).

279. Sarx, B. and Baechmann, K. Z. Anal. Chem., 316, 621. (1983).
280. Hanamura, S., Smith, B.W. and Winefordner, J.D. Anal. Chem., 55, 2026. (1983).
281. Chen, R.W., and Ganther, H.E. Environ. Physiol. Biochem. 5, 378. (1975).
282. Kotsonis, F.N., and Klaassen, C.D. Toxicol. Appl. Pharmacol. 42, 583. (1977).
283. Suzuki, K.T. Anal. Biochem. 102, 31. (1980).
284. Scheuhammer, A.M., Cherian M.G. Toxicol. Appl. Pharmacol. 82, 417. (1986).
285. Lehman, L.D., Klaassen, C.D. Anal. Biochem., 153, 305. (1986).
286. Piotrowski, J.K., Bolanowska, W., and Sapata, A. Acta Biochim. Polon. 20, (3), 207. (1973).
287. Zelazowski, A.J., and Piotrowski, J.K. Acta Biochim. Pol. 24, 97. (1977).
288. Piotrowski, J.K., Bolanowska, w., and Sapota, A. Acta Biochim. Pol. 20, 207. (1973).
289. Leibbrandt, M.E.I., Koropatnick, J., Harris, J.F., and Cherian, M.G. Biological Trace Element Research, 30, 245. (1991).
290. Onosaka, S., Kehchi, T., Col, M., and Kunio, O. Eisei Kagaku 24, (30), 128. (1978).
291. Eaton, D.L., and Toal, B.F. Toxicology and Applied Pharmacology 66, 134. (1982).
292. Onosaka, S. and Cherian, M.G. Toxicol. Appl. Pharmacol., 63, 270. (1982).
293. Olafson, R.W., and Sim, R.G. Anal. Biochem. 100, 343. (1979).
294. Miller, C.R., Zhu, S.Y., Victory, W., Goyer, R.A. Toxicol. Appl. Pharmacol., 84, 584. (1986).
295. Chang, C.C., vander Mallie, R.J., and Garvey, J.S. Toxicol. Appl. Pharmacol. 55, 94. (1980).
296. Tohyama, C., and Shaikh, Z.A. Fund. Appl. Toxicol. 1, 1. (1981).

297. Durnam, D., Perrin, F., Gannon, F., and Palmiter, R.D. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 77, 6511. (1980).
298. Van Beek, H. and Baars, A. Journal of Chromatography, 442, 345. (1988).
299. VanderMallie, R.J., Garvey, J.S. J. Biol. Chem. 254, 8416. (1979).
300. Madapallimattam, G., and Riordan, J.R. Biochem. Biophys. Res. Commun. 77, 1286. (1977).
301. Tohyama, C., and Shaikh, Z.A. Biochem. Biophys. Res. Commun. 84, 907. (1978).
302. Tohyama, C., Shaikh, Z.A., Ellis, K.J., Cohn, S.H. Toxicology, 22, 181. (1981).
303. Vander Mallie, R.J., and Garvey, J.S. Immunochemistry 15, 857. (1978).
304. Grider, A., Kao, K.-J., Klein, P.A., and Cousins, R.J. J. Lab. Clin. Med., 113, 221. (1989).
305. Thomas, D.G., Linton, H.J., and Garvey, J.S. J. Immunol. Methods, 89, 239. (1983).
306. Durst, R.A. and Staples, B.R. Clinical Chemistry, 18 (13), 206, (1972).
307. Van Beek, H., Greejkes, H. and Baars, A.J. Talanta 34, 580 (1987).
308. "Analytical methods for Atomic Absorption Spectrophotometry" Perkin-Elmer, eds. (1982).
309. Feldman, S.L. and Cousin, R.J. Biochem. J., 160, 583. (1976).
310. Rimbow
311. Brdicka, R. Collect. Czech. Chem. Commun, 5, 112, (1933).
312. "Structure and Bonding 72" Bioinorganic Chemistry, F.A. Armstrong (Ed. M.J. Clarke and col.) Springer-Verlag, 1990, pp. 139-221.
313. Kolthoff, I.M. and Lingage, J.J. "Polarographic" Interscience Publishers, 1952.
314. Schmidt, H. and Von Stalkelberg, M. "Modern Polarografic Methods", Academic Press, (1963).

315. Peter, F. and Rosset, R. *Analytical Chimica Acta*, 79, 47, (1975) .
316. Birke, R.L. and Mazorra, M. *Analytica Chimica Acta*, 118, 257, (1980).
317. Stankovich, M.T. and Bard, A.J. *J. Electroanal. Chem.* 75, 487, (1977).
318. Bianco, P. and Haladjian, J. *Electrochimica Acta*, 25, 1317, (1980) .
319. Miller, I.R. and Teva, J. *J. Electroanal. Chem.*, 36, 157, (1972).
320. Grier, R.A. and Andrews, R.W. *Analytica Chimica Acta*, 124, 333, (1981).
321. Mairesse-Ducarmois, C.A., Patriarche, G.J. and Vandenbalch, J.L. *Analytica Chimica Acta*, 79, 69, (1975).
322. Mairesse-Ducarmois, C.A., Patriarche, G.J. and Vandenbalch, J.L. *Analytica Chimica Acta*, 84, 47, (1976).
323. Cassasas, E., Ariño, C., Esteban, M. and Redondo, A. *Analytical Letters*, 24(7), 1183, (1991) .
324. Mairesse-Ducarmois, C.A., Patriarche, G.J. and Vandenbalch, J.L. *Analytica Chimica Acta*, 76, 299, (1975).
325. Palecek, E. and Pechan, Z. *Anal. Biochem.*, 42, 59, (1971).
326. Betso, S.R., Klapper, M.H. and Anderson, L.B. *Journal of the American Chemical Society*, 15, 8197, (1972).
327. Stankovich, M.T. and Bard, A.J. *J. Electroanal. Chem.* 85, 173, (1977).
328. Stankovich, M.T. and Bard, A.J. *J. Electroanal. Chem.* 86, 189, (1978).
329. Brabec, V. and Mornstein, V. *Biochimica et Biophysica Acta*, 625, 43, (1980).
330. Wang, J., Luo D-B., Farias, P.A.M., and Mahmoud, J.S. *Anal. Chem.*, 57, 158, (1985).
331. Rodrigues, C.G., Farchiones, F., Wedd, A.G. and Bond, A.M. *J. Electroanal. Chem.*, 218, 251, (1987).
332. Bianco, P. and Haladjian, J. *J. Electroanal. Chem.*, 119, 365, (1986).
333. Palecek, E. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 15, 275, (1986).

- 334. Wagner-Roos, L., Zahn, H., Séquaris, J.-M. and Valenta, P. Toxicological and Environmental Chemistry, 22, 77, (1984).
- 335. Olafson, R.W. and Sim, R.G. Analytical Biochemistry, 100, 343, (1979).
- 336. Olafson, R.W. and Sim, R.G. The Journal of Biological Chemistry, 256(3), 1263, (1981).
- 337. Onasaka, S. and Cherian, M.G. Toxicology and Applied Pharmacology, 63, 270, (1982).
- 338. Cosson, R.P. and Thompson, J.A.J. Analusis, 11(1), 33, (1983).
- 339. Thompson, J.A.J. and Cosson, R.P. Marine Environmental Research, 11, 137, (1984).
- 340. Olafson, R.W. Bioelectrochemistry and Bioenergetics, 19, 111, (1988).
- 341. Bebianno, M.J. and Langston, W.J. Portugaliae Electrochimica Acta, 7, 59, (1989).
- 342. Charlot, G., Bador-Lambling, J. and Tremillon, B. "Les réactions électrochimiques" Massn. Paris. (1959).
- 343. "Polarographic Determination of Composition and Thermodynamic Stability Constant of Complex Metal Ion", Marin, D. and Mendicut, F. Journal of chemical Education, 65(10), 916, (1988).
- 344. Furey et al. Science, 231, 704, (1986).